

**MARCELA CÂMARA MACHADO COSTA**

**ESTUDO DA PELE NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo  
programa de Pós-graduação em Neurociências

**SÃO PAULO**

**2011**

**Marcela Câmara Machado Costa**

**ESTUDO DA PELE NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Neurociências

Orientador: Profa.Dra. Helga Cristina de Almeida Silva

Co-Orientador: Profa.Dra Luciana Moura Alves

São Paulo

2011

Costa, Marcela Câmara Machado

**Estudo da pele na Esclerose Lateral Amiotrófica.**/ Marcela Câmara Machado Costa.-- São Paulo, 2011.

xi, 102 f

Tese Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Neurociências.

Título em inglês: Study of the skin in amyotrophic lateral sclerosis

1. doença do neurônio motor. 2.neurônio. 3.genética. 4.nervo. 5.pele

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO NEUROLOGIA/NEUROCIÊNCIAS**

**Chefe do Departamento:** Mirto Nelso Prandini

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:** Maria da Graça Naffah Mazzacorati

**Marcela Câmara Machado Costa**

**ESTUDO DA PELE NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. ANAMARLI NUCCI

Prof. Dr. BENY SCHMIDT

Prof. Dr. MIGUEL MITNE NETO

Profa. Dra. MONIZE LAZAR MAGALHÃES

## **Agradecimentos**

À Deus por tornar as coisas possíveis.

À minha orientadora , Dra Helga Silva, pela imensa ajuda, incentivo e paciência.

À Luciana Moura por me ajudar com as técnicas de biópsia de pele.

Ao Dr Acary Souza Bulle Oliveira pelos ensinamentos nas doenças neuromusculares, e sobretudo, pelo exemplo de amor e respeito com os pacientes.

À querida Marlene Rocha por todo carinho e cuidado durante o tempo em que estive no seu laboratório.

Ao Dr Benny Schmidt pelos valiosos ensinamentos na patologia muscular.

Aos amigos Moacir, Thais, Renata e Cláudia pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do setor de Doenças Neuromusculares pela ajuda, especialmente a Sra Roseli, Cláudio, Márcia, Elaine e toda a equipe da Abrela.

À Miguel Mittne, pela ajuda no encontro dos pacientes.

A todos os pacientes incluídos nesta tese, especialmente Hyldon Correia e Fernando, por acreditarem sempre na vida.

À toda minha família, especialmente meus pais, Jaime e Lígia, por sempre acreditarem em mim e tornarem minha formação médica possível.

À meu querido irmão Marcos, exemplo de fé e superação.

Ao meu amor e esposo André Leonardo, pelo amor incondicional.

## Sumário

<b>Agradecimentos</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumo</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Esclerose Lateral Amiotrófica	1
1.2 Pele na ELA	8
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>4 CASUÍSTICAS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
4.1.Casuística	14
4.2.Métodos	16
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
<b>8 ANEXOS</b>	<b>76</b>
<b>9 REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>100</b>

## **Lista de figuras**

<b>Figura 1-</b> esquema de medida da epiderme	22
<b>Figura 2 -</b> Azul de Alcian	22
<b>Figura 3-</b> Ferro Coloidal	23
<b>Figura 4-</b> Esquema de medida de espessura da derme	23
<b>Figura 5-</b> Espessura da epiderme em controles	48
<b>Figura 6-</b> Azul de Alcian em controles	48
<b>Figura 7-</b> Ferro Coloidal em controles	48
<b>Figura 8-</b> Espessura da epiderme em ELA esporádica	48
<b>Figura 9-</b> Azul de Alcian em ELA esporádica	48
<b>Figura 10-</b> Ferro Coloidal em ELA esporádica	49
<b>Figura 11-</b> Espessura da epiderme em ELA 8	49
<b>Figura 12-</b> Azul de Alcian em ELA 8	49
<b>Figura 13-</b> Ferro Coloidal em ELA 8	49
<b>Figura 14-</b> Nervo intraepidérmico em controle	51
<b>Figura 15-</b> Nervo intraepidérmico em ELA esporádica	54
<b>Figura 16-</b> Nervo intraepidérmico em ELA 8	55



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Critérios de El Escorial	3
<b>Tabela 2.</b> Classificação das correlações de acordo com o coeficiente de correlação (r)	24
<b>Tabela 3.</b> Dados demográficos resumidos e comparação dos grupos controle, ELA esporádica e ELA 8 relacionados por cor, sexo, idade expressa em anos e tabagismo	26
<b>Tabela 4.</b> Dados clínicos de pacientes com ELA esporádica	27
<b>Tabela 5.</b> Exame neurológico de pacientes com ELA esporádica e ELA 8	29
<b>Tabela 6.</b> Exame de força muscular de pacientes com ELA esporádica e ELA 8	30
<b>Tabela 7.</b> Dados clínicos de pacientes com ELA 8	32
<b>Tabela 8.</b> Dados clínicos - grupo ELA esporádica versus ELA 8: idade/tempo de doença referidos pelos pacientes	34
<b>Tabela 9.</b> Dados clínicos - grupo ELA esporádica versus ELA 8: sintomas referidos pelos pacientes/suporte ventilatório/traqueostomia	35
<b>Tabela 10.</b> Correlação entre tempo/idade de início de fraqueza, expressa em anos e uso de traqueostomia em pacientes ELA esporádica e ELA 8	36
<b>Tabela 11.</b> Correlação entre tempo/idade de início de fraqueza, expressa em anos, e uso de ventilação não invasiva em pacientes ELA esporádica e ELA 8	37
<b>Tabela 12.</b> Correlação entre uso de BiPAP e tempo de doença (considerando fraqueza) / sexo nos grupos ELA esporádica e ELA 8	38
<b>Tabela 13.</b> Avaliação de marcha de pacientes com ELA esporádica e ELA 8	39
<b>Tabela 14.</b> Dados clínicos - grupo ELA esporádica versus grupo ELA 8: sinais ao exame neurológico	40
<b>Tabela 15.</b> Correlação entre El Escorial e ELA esporádica e ELA 8	40
<b>Tabela 16.</b> Dados clínicos de pacientes com ELA 8 quando comparados os sexos	41
<b>Tabela 17.</b> Exame neurológico ELA 8 – comparativa entre os sexos	42
<b>Tabela 18.</b> Escala funcional de marcha quando comparado ao sexo na ELA 8 (%)	43

## Lista de tabelas

<b>Tabela 19.</b> Queixa sensitiva comparada a idade/tempo de início de sintomas fraqueza, câibras e tremor em pacientes com ELA esporádica e ELA 8	44
<b>Tabela 20.</b> ELA 8 – subgrupo com queixa sensitiva: idade de início e tempos de fraqueza/câibra/tremor/uso de BIPAP dos homens em relação às mulheres	45
<b>Tabela 21.</b> Espessura de epiderme, Azul de Alcian e Ferro coloidal nos grupos controle, ELA esporádica e ELA 8	46
<b>Tabela 22.</b> Razão da espessura de epiderme em relação à idade entre grupos controle, ELA esporádica e ELA 8	47
<b>Tabela 23.</b> Densidade de FNIE – comparação entre os grupos	50
<b>Tabela 24.</b> Associação entre tabagismo, fraqueza, câibra, sinais piramidais, traqueostomia, queixa sensitiva e alterações nas sensibilidades e densidade de FNIE em pacientes com ELA esporádica	53
<b>Tabela 25.</b> Associação entre tabagismo, fraqueza, câibra, sinais piramidais, traqueostomia, queixa sensitiva e alterações nas sensibilidades e densidade de FNIE em pacientes com ELA 8	56
<b>Tabela 26. Anexo-</b> Indivíduos controles normais, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos	76
<b>Tabela 27. Anexo-</b> Pacientes com ELA esporádica, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos	78
<b>Tabela 28. Anexo -</b> Dados clínicos dos pacientes com ELA esporádica	79
<b>Tabela 29. Anexo -</b> Pacientes com ELA 8, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos	80
<b>Tabela 30. Anexo -</b> Dados clínicos dos pacientes com ELA 8	82
<b>Tabela 31. Anexo –</b> Densidade de fibras intraepidérmicas nos indivíduos do grupo controle	84
<b>Tabela 32. Anexo –</b> Densidade de fibras intraepidérmicas no grupo ELA esporádica	86
<b>Tabela 33. Anexo –</b> Densidade de fibras intraepidérmicas no grupo ELA 8	87

## **Lista de abreviaturas**

<b>AINH</b>	Antiinflamatórios não hormonais
<b>BiPAP</b>	Dois níveis de pressão positiva nas vias aéreas
<b>ELA</b>	Esclerose Lateral Amiotrófica
<b>ELA 8</b>	Esclerose Lateral Amiotrófica familiar tipo 8
<b>ENMG</b>	Eletroneuromiografia
<b>FNIE</b>	Densidade de fibra intraepidérmica
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>NMI</b>	Neurônio motor inferior
<b>NMS</b>	Neurônio motor superior
<b>VMNI</b>	Ventilação mecânica não invasiva

## Resumo

**Introdução:** A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, progressiva e incurável, com origem multifatorial. Tem como principais manifestações clínicas espasticidade, hiperreflexia, sinal de Babinski, atrofia e fraqueza muscular, fasciculações e câibras. O envolvimento sensitivo é descrito como raro nesta doença e, apesar de haver limitação da função motora e o paciente ficar restrito à cadeira de rodas e leito, o desenvolvimento de escaras é muito raro. Cerca de 90% dos casos são de apresentação esporádica e 10 % familiares. A Esclerose Lateral Amiotrófica familiar do tipo 8 foi descrita pela primeira vez no Brasil, com um grande número de famílias descritas até o momento. Essa forma da doença apresenta peculiaridades clínicas na sua apresentação, como envolvimento mais importante do segundo neurônio, tremor e evolução mais lenta que o observado nas formas esporádicas da doença. **Objetivo:** correlacionar as características demográficas/clínicas, em particular as alterações de sensibilidade à avaliação neurológica, com as características histológicas de pele em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica familiar tipo 8 e comparar com os achados de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica Esporádica e de controles. **Métodos:** Foram selecionados 40 pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar tipo 8 e 14 paciente com Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica e avaliados por meio de exame neurológico e eletroneuromiografia, com atenção às queixas sensitivas e alterações objetivas de sensibilidade. Foram realizadas biópsias de pele nestes pacientes e em 37 controles na porção lateral distal da perna direita. As biópsias foram processadas com técnica de imunofluorescência indireta usando o PGP 9,5 para análise de densidade de fibras nervosas intraepidérmicas. Em 15 indivíduos, 5 em cada grupo (ELA 8, ELA esporádica e controles), foram realizadas também biópsias na porção lateral distal de perna esquerda para avaliação de espessura da epiderme e pesquisa de glicosaminoglicanos por colorações de ferro coloidal e alcian blue. Os dados foram analisados por programa Graphpad Prism 5.03. **Resultados:** Ao comparar características clínicas dos pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica, o subgrupo ELA 8 apresenta idade de início dos sintomas mais precoce, mais pacientes brancos, com câibra e tremor precedendo a fraqueza, além de tremor estar presente em 82,5% dos pacientes, menor envolvimento distal de membros inferiores, com predomínio de

sinais do neurônio motor inferior e tempo maior de evolução de doença. Foram encontradas alterações sensitivas em ambos os grupos de Esclerose Lateral Amiotrófica. Houve redução de densidade de fibras intraepidérmicas nas duas formas de Esclerose Lateral Amiotrófica quando comparadas a controles. Somente nos pacientes com ELA 8 havia relação positiva entre a alteração de sensibilidade vibratória e redução de densidade de fibras nervosas intraepidérmicas. As alterações descritas previamente quanto a estrutura, acúmulo de glicosaminoglicanos e ferro não foi reproduzível nos pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica estudados. **Conclusões:** O grupo ELA 8 apresenta características clínicas e demográficas distintas do grupo ELA esporádica. As alterações de sensibilidade e de densidade de FNIE, em geral, são similares aos descritos previamente em pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, que acomete principalmente os neurônios motores da medula espinhal, tronco cerebral e encéfalo. É a forma mais comum de doença dos neurônios motores do adulto. (STRONG,ROSENFELD,2003).

#### Histórico

A ELA foi descrita por Charcot, em 1869 (CHARCOT, JOFFROY, 1869), que observou achados clínicos de amiotrofia e espasticidade associados à degeneração do corno anterior e fascículo lateral da medula espinhal vistos à necropsia. Desde a descrição inicial, pouco se acrescentou às manifestações clínicas de sinais dos neurônios motores superior e inferior.

Em sua homenagem, a Esclerose Lateral Amiotrófica é conhecida como Doença de Charcot na Europa. Posteriormente, foi chamada de Doença de Lou Gehrig nos Estados Unidos, em homenagem a um famoso jogador de basebol que apresentou a doença no auge da sua carreira aos 35 anos de idade (ROWLAND, 2000).

#### Epidemiologia

A Esclerose Lateral Amiotrófica é encontrada em todo o mundo com incidência e prevalência semelhantes, com uma incidência global de cerca de 2 por 100.000 (KIERNAN et al.,2011). A ELA acomete mais homens que mulheres,numa proporção de 3:2, não havendo predileção por etnia. Em geral a ELA surge na meia idade e aproximadamente 15% se iniciam antes dos 40 anos (STRONG et al.,2003).

Entretanto, há uma elevada prevalência na Ilha de Guam no Pacífico, cerca de 50 vezes mais frequente, levando a hipótese de fatores genéticos e ambientais locais (COX et al., 2003); recentemente isso foi atribuído ao hábito de ingerir morcegos que se alimentavam de vegetais da família das *cacadáces*, ricos em ácido beta-metilamino-L-alanina (L-BMAA), produzido por cianobactérias simbióticas. Este ácido é

neurotóxico e foram encontradas concentrações cerca de 10 vezes mais elevadas em cérebros de necrópsia de pacientes daquela região. Nessas formas do Pacífico Oeste, nenhum fator genético isolado se encontra fortemente relacionado à ocorrência da doença.

### **Quadro clínico**

A forma clássica tem evolução progressiva, com acometimento dos neurônios motores superior (NMS): hiperreflexia, espasticidade, sinal de Babinski, sinal de Hoffmann e clônus) e inferior (NMI): fraqueza, atrofia e fasciculações, com sobrevida média de 3 a 5 anos. O quadro clínico se caracteriza por atrofia e fraqueza muscular generalizadas, hiperreflexia, espasticidade, disfagia, disfonia e dispneia com instalação de insuficiência respiratória restritiva, que geralmente é a causa do óbito. O diagnóstico é clínico, apoiado pelos achados de ENMG, devendo-se descartar outras doenças potencialmente tratáveis (ROWLAND, 2000).

Os critérios diagnósticos empregados atualmente foram estabelecidos em El Escorial pela Federação Mundial de Neurologia (*World Federation of Neurology*), sendo revistos em 1998 (ROOS et al., 1998, BROOKS et al., 2000). São necessários: presença de sinais de envolvimento do NMI (baseados no exame clínico, eletroneuromiográfico ou anatomopatológico) em uma ou mais de quatro regiões (bulbar, cervical, torácica e lombossacral); sinais de envolvimento do NMS (mediante exame físico) em uma ou mais de quatro regiões; alterações do tipo neurogênicas na ENMG em músculos clinicamente normais (combinação de onda aguda positiva ou potenciais de fibrilação, compatíveis com padrão de deservação aguda, e potenciais de longa duração e alta amplitude, rarefeitos, compatíveis com deservação e reinervação crônica); sinais de progressão em uma ou mais regiões. Além disso, exige-se a ausência de envolvimento sensitivo, autonômico e visual, doença de Parkinson ou alterações em exames de neuroimagem que poderiam explicar os achados neurogênicos na ENMG. A partir destes dados foram criados critérios para definição de ELA definida, provável, possível e suspeita (tabela 1).

**Tabela 1** Critérios modificados para ELA (WFN EI Escorial, 1998)

Suspeito	Possível	Provável	Provável	Definido
(auxílio laboratorial)				
Sinais de comprometimento	NMS + NMI	NMS + NMI	NMS + NMI	NMS + NMI
NMI > 2 regiões	1 região	1 região	2 regiões	3 regiões
Ou	NMS : NMI	Pré-clínico	NMS : NMI	NMS : NMI
	2 regiões	NMI somente	>2 regiões	>3 regiões
Sinais de comprometimento	ENMG:			
NMS em >1 região	Deservação aguda em pelo menos dois membros			

Legenda: Regiões bulbar, cervical, torácica e lombar. NMS neurônio motor superior; NMI neurônio motor inferior; ENMG-eletroneuromiografia

Os pacientes com ELA podem ainda apresentar alterações gastrointestinais, como sialorreia, retardo no esvaziamento gástrico e redução do peristaltismo colônico, disfunções dos nervos glossofaríngeo e vago (TOEPFER et al., 1999).

Alterações psiquiátricas como labilidade emocional, manifestação comum da paralisia pseudobulbar, podem ser erroneamente interpretadas como depressão reativa devido ao diagnóstico (ROWLAND, 2000).

É importante ressaltar que na ELA pura as funções autonômicas e sensoriais permanecem intactas. Nesse sentido, as funções cardíaca, e esfinteriana, pressão arterial, temperatura, olfato, tato, audição, visão e percepção dolorosa não são, em geral, alterados. Entretanto, a entidade clínica conhecida como ELA complicada pode cursar com disfunções autonômicas (principalmente reflexos cardiovasculares anormais e disfunção vesical) e prejuízo da percepção sensitiva, com redução da sensibilidade vibratória e térmica (STRONG, GORDON, 2005).



Até o momento não existe exame que seja marcador definitivo para o diagnóstico de ELA, com alguns exames mostrando comprometimento de NMS e outros, somente de NMI (SILANI,2011). A ressonância magnética com a sequência *spin echo* /SE T1 com pulso adicional de transferência de magnetização (MTC/SET1) é útil para a demonstração de envolvimento do trato córtico-espinhal quando os pacientes apresentam comprometimento de NMS. A imagem por tensão de difusão permite a realização do estudo de todo o trato córtico-espinhal (tractografia), com análise volumétrica deste trato, permitindo o diagnóstico topográfico de lesão do NMS. Ainda para avaliar o primeiro neurônio motor, a estimulação magnética transcutânea permite a exploração da função inibitória cortical, avaliando lesão no trato cortico-espinhal, mesmo na ausência clínica de sinais de envolvimento desta via (ROCHA,MAIA JUNIOR,2012). Para avaliação do segundo neurônio motor, usa-se a densidade de unidade motora, avaliada pela eletromiografia (SILANI,2011).

O diagnóstico diferencial é feito com várias doenças neurológicas, muitas delas condições tratáveis, que podem mimetizar o quadro de ELA, e que possuem exames e quadro clínico específico. Temos como exemplo a atrofia muscular espinhal, com envolvimento do neurônio motor inferior, com diagnóstico realizado por avaliação genética, cujo defeito se encontra no cromossomo 5, no locus 5q13.2, nos exons 7 e 8, local codificador da proteína SMN (Survivor Motor Neuron) responsável pela sobrevivência da população neuronal. Miopatias inflamatórias, miopatias distais e distrofia miotônica de Steinert são importantes diagnósticos e condições com prognóstico diferentes da ELA (MEINIGER,2011).

Várias doenças do nervo periférico fazem diagnóstico diferencial com a ELA, como mononeurite múltipla, e neuropatia motora multifocal com bloqueio de condução, neuropatias tóxicas. Outras doenças que acometem o sistema nervoso central devem ser afastadas como compressões cervicais, siringomielia, Esclerose Múltipla e tumores cranianos (MEINIGER,2011).

## **Genética**

Em 10% dos casos há história familiar e sua causa é genética, sendo que a mutação mais frequente era considerada a da enzima super-óxido dismutase (SOD1) no cromossomo 21, que correspondia a 20 % dos casos familiares, sendo a forma

hereditária mais estudada até o momento (MILLECAMPS, 2010; SIDDIQUE, AJROUD-DRISS, 2011). Entretanto, em 2011, foi descrita a associação de expansão CAG no gene da ataxina 2 (ATXN2) com a ELA, que corresponderia a 40% dos casos de ELA familiar em algumas populações (DAOUD et al., 2011).

O gene SOD1 é integrante do *locus* 21q22 (ROWLAND, 2000). Esta mutação causa uma forma dominante da doença e este foi o primeiro gene identificado associado a ELA (ELA 1). Mais de 100 mutações já foram descritas em tal gene (STRONG et al., 2005), sendo a substituição de valina por alanina na posição A4V a forma mais comum. Normalmente, a enzima cobre/zinco superóxido desmutase (SOD1) realiza a desmutação do radical livre superóxido ( $O_2^-$ ) em água oxigenada e oxigênio molecular. Com a diminuição da atividade da SOD1, ocorre acúmulo de superóxido e ligação deste ao óxido nítrico, com formação de novos radicais livres (peroxidonitrila e hidroxila) e consequente neurotoxicidade por estresse oxidativo (RIZZARDINI et al., 2005). Outras possibilidades para a lesão associada à mutação do SOD1 foram propostas, tais como o estresse do retículo endoplasmático, inibição proteassoma, lesão mitocondrial, secreção aberrante de SOD1 mutante e prejuízo do transporte axonal (KIERNAN et al., 2011).

A seguir foram descritas outras formas familiares, como a demência frontotemporal associada a parkinsonismo e amiotrofia com mutação em 17q21-22 (HULETTE et al., 1999).

A ELA 4 é uma variante autossômica dominante e de início juvenil, associada com mutações no gene da senataxina em 9q34 (CHEN, 2004).

A ELA 2, uma variante autossômica recessiva de início juvenil (*locus* do gene da proteína alsina) com mutação em 2q33. (YANG et al., 2001;) Essa forma tem como características o predomínio de sinais do trato corticoespinal, sendo frequente na Tunísia (HADANO et al., 2001).

No Brasil, foi identificada uma mutação em 20q13.33 (região que codifica a proteína VAPB) responsável pela variante ELA familiar tipo 8, uma forma familiar autossômica dominante de início tardio e progressão lenta, que parece afetar igualmente ambos os sexos (NISHIMURA et al., 2004). Essa mutação (c.166C>T {p.Pro56Ser}) foi descrita em uma grande família proveniente de Minas Gerais, de

ascendência portuguesa, com uma mutação com efeito fundador de 23 gerações anteriores, em um ancestral Português que veio ao Brasil no período colonial (NISHIMURA et al., 2005). Esses pacientes manifestam uma doença lentamente progressiva, com presença de tremor distal precedendo os sinais e sintomas de doença do neurônio motor, além de intensas câibras e protrusão abdominal (NISHIMURA et al., 2004). Em 2010, FUNKLE et al. descreveram o primeiro caso sem ancestralidade brasileira ou portuguesa com a mutação na P56S, em um paciente alemão, com características clínicas semelhantes aos casos descritos no Brasil.

## **Tratamento**

Apesar dos grandes avanços no cuidado dos pacientes com ELA nos últimos anos, proporcionando aos pacientes maior longevidade e com melhor qualidade de vida, a cura ainda não foi descoberta. À medida que a fisiopatologia da doença é mais conhecida, tem-se conseguido melhores condições de cuidados para estes indivíduos. (CARVALHO, SWASH, 2011).

Para um tratamento mais abrangente e eficaz é necessária uma equipe multidisciplinar, envolvendo neurologistas, fisioterapeutas (sintomas motores e respiratórios), terapeutas ocupacionais (independência nas atividades diárias), fonoaudiólogos, psicólogos, enfermeiros, assistentes sociais e nutricionistas. Uma atitude positiva e esperançosa frente ao diagnóstico da ELA contribui para um prognóstico mais favorável (GROSSMAN, BRADLEY, 2003). Nesse sentido, a participação da equipe multidisciplinar, ao limitar as perdas funcionais e permitir a reabilitação, é de fundamental importância.

Os medicamentos utilizados no tratamento da ELA podem ser divididos em drogas modificadoras de curso e drogas sintomáticas. Dentre as primeiras, o Riluzole (2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazole) é o único que possui eficácia comprovada por inúmeros estudos de epidemiologia clínica (TAYNOR et al., 2006). O Riluzole bloqueia a liberação de ácido glutâmico e retarda a progressão da doença ao reduzir a neurotoxicidade mediada por glutamato (BENAVIDES et al., 1985), aumentando, dessa forma, a sobrevida dos pacientes em 3 a 6 meses. Administrado na dose de 50mg duas vezes ao dia, o Riluzole é geralmente bem tolerado, embora alguns pacientes apresentem náuseas e astenia (FELDMAN, 2004).

O objetivo maior de estudos clínicos atuais é encontrar compostos que sejam capazes de parar a degeneração do motoneurônio, sendo importante o diagnóstico precoce destes pacientes para que sejam incluídos mais precocemente em ensaios clínicos.

Embora ainda não se consiga curar ou mesmo estender significativamente a sobrevida dos pacientes com ELA, muitos tratamentos podem ser prescritos para o alívio sintomático da doença (GORDON, 2011). A ansiedade pode ser manejada com buspirona e benzodiazepínicos. Inibidores seletivos de recaptção de serotonina são alternativas para o tratamento da depressão. As câibras e espasticidades são controladas com o uso de baclofeno (GORDON, 2011). As fasciculações podem ser tratadas com carbamazepina ou gabapentina e a amitriptilina pode ser usada na terapêutica da insônia, dos risos e choros imotivados e da sialorreia. Por fim, as dores causadas por câibras musculares, espasticidades, rigidez articular e cólicas abdominais, que afetam grande parte dos pacientes, são manejadas com opióides, devido à refratariedade destas aos AINH (FELDMAN, 2004).

Além do uso de medicamentos, a ELA exige a adoção de uma série de medidas não medicamentosas. A evolução da disfagia e das alterações de motilidade do trato gastrointestinal podem exigir a realização de uma gastrostomia percutânea para a infusão da dieta (HARDIMAN, 2000).

A fraqueza dos músculos da respiração (intercostais, diafragma e abdominais) resulta em dispneia e diminuição do reflexo da tosse, com conseqüente acúmulo de secreções no aparelho respiratório. Nas situações de insuficiência respiratória preconiza-se o uso do BiPAP oro-nasal, enquanto na dificuldade de expectoração utiliza-se o assistente de tosse ou "*cough assist*" (LECHTZIN et al., 2002). O uso de traqueostomia pode prolongar a vida por anos, o que para algumas pessoas pode não ser considerado válido.

A tecnologia das células-tronco encontra-se em fase inicial de seu desenvolvimento e inúmeros fatores intrínsecos da técnica dificultam seu emprego atual no tratamento da ELA, como por exemplo, a tendência da célula tronco neuronal

se diferenciar em célula glial. Entretanto, a grande necessidade de terapias mais efetivas pode, eventualmente, legitimar a realização de experimentos clínicos com as células tronco (SILANI et al., 2002).

## **1.2. Pele na ELA**

### **Pele normal**

A pele, maior órgão do ser humano, tem duas camadas – epiderme e derme. A epiderme é constituída por dois tipos celulares principais; os queratinócitos e as células dendríticas (macrófagos modificados). Os queratinócitos são as células responsáveis pela diferenciação e formação das camadas celulares da epiderme. À medida que ocorre diferenciação dos queratinócitos são formadas as camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea. A camada basal está localizada junto à derme e consiste de uma monocamada de células cubóides ricas em ribossomos. A camada espinhosa está localizada acima das células basais e contém grande quantidade de queratina. A camada granulosa possui células achatadas localizadas sobre a camada espinhosa. A camada córnea está localizada mais superficialmente e consiste de células achatadas, anucleadas, sendo que cada célula cornificada cobre aproximadamente 25 células basais. A epiderme e a derme estão separadas por uma membrana basal cujo componente principal é o colágeno IV. A derme é formada basicamente de tecido conjuntivo e possui duas regiões, a derme papilar e a reticular, respectivamente ricas em colágeno denso e frouxo. Dentro da derme são encontradas as seguintes estruturas: folículo piloso, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas, corpúsculos nervosos e fibras nervosas (JUNQUEIRA,CARNEIRO, 1998).

### **Úlceras de pressão**

Úlceras de pressão são lesões cutâneas ou de partes moles, superficiais ou profundas, de etiologia isquêmica, secundária a um aumento de pressão externa sobre a pele, em geral localizadas sobre proeminências ósseas. Os locais mais comuns para aparecimento são as regiões sacra, transtrocanterianas e isquiáticas, seguidas por

maléolos, calcanhares e joelhos. Cerca de 10 % dos casos ocorrem em outros locais da coluna vertebral, escápula e cotovelos (GEFEN,2007).

O diagnóstico da úlcera de pressão é clínico, feito pela observação de lesão, que pode ser classificada em estágios de gravidade. O estágio I é definido como eritema em pele íntegra. No estágio II observa-se também perda parcial da espessura da pele, envolvendo a epiderme ou a derme; a pele não está mais íntegra. O estágio III é caracterizado, além disso, por perda local da espessura total da pele, acometendo tecido subcutâneo (hipoderme), com necrose ou não, sem envolvimento da fáscia. No IV há lesão extensa de pele, com necrose de tecidos e envolvimento de músculos, ossos ou outras estruturas mais profundas (SHEA 1975).

As úlceras de pressão são causadas por fatores intrínsecos e extrínsecos ao paciente. Os fatores extrínsecos descritos são a pressão externa, o cisalhamento, a fricção e a umidade, sendo a pressão considerada o principal fator causador e seu efeito patológico deve-se tanto à intensidade e duração dessa pressão como à tolerância do tecido (SHEA 1975).

Os fatores considerados intrínsecos são a idade do paciente, seu estado nutricional, a perfusão tecidual, o uso de alguns medicamentos especialmente os que alteram nível de consciência além de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas (BLANES et al., 2004).

Com relação à idade, é observado aumento de incidência dessas úlceras em indivíduos acima de 60 anos, o que é explicado pelas mudanças que ocorrem com o envelhecimento do indivíduo. Dentre essas mudanças está a redução de produção de fibroblastos que afeta diretamente a produção de colágeno, que é a principal proteína responsável pela força tensil. Outras mudanças observadas são diminuição da camada dérmica e de sua vascularização, além de redução da camada epidérmica, o que diminui sua função de barreira, deixando a pele mais susceptível a lesões (REDDY et al, 2006).

As úlceras de pressão são mais comuns em pacientes de cor branca; a proteção associada a indivíduos de cor negra ocorreria por aumento de compactação do estrato córneo, que dá à pele maior resistência às irritações químicas e se torna uma barreira mais eficiente contra agressões externas causadas por umidade e pressão (BLANES et al.,2004).

Doenças crônicas e incapacitantes, principalmente neurológicas, que deixam o paciente restrito ao leito, comumente evoluem com úlceras de pressão, com grande impacto na morbi-mortalidade do paciente.

### **Alterações da pele na ELA**

O desenvolvimento dessas úlceras de pressão é incomum na ELA, como notado já por Charcot no século 19 (REDDY et al., 2006, TEIVE et al., 2011). Os motivos para essa característica que têm sido propostos são as diferenças na composição da pele desses pacientes e a ausência de alterações sensitivas na ELA.

A pele dos pacientes com ELA é comumente relatada como mais flexível e com menor elasticidade. Quando esticada, a pele apresenta uma latência aumentada para o retorno ao seu estado inicial. Esse fenômeno é frequentemente observado após dois anos e meio do início dos primeiros sintomas (ONO et al., 1988). As alterações moleculares descritas que parecem contribuir para essa característica ocorrem no colágeno (maior compactação), em glicosaminoglicanos (diminuição) e cursam com o aparecimento de placas amilóides.

Por outro lado, apesar da ausência de alterações sensitivas serem um critério diagnóstico da ELA, sabe-se hoje que alterações sensitivas podem ser encontradas, a depender o critério usado, em 7 até 32% dos pacientes (HAMMAD et al., 2007; WEIS et al., 2011). Entre os métodos diagnósticos clássicos para avaliar alterações de nervos periféricos, temos a ENMG e a biópsia de nervo sural. A ENMG mostra grande sensibilidade para avaliação de fibras de grosso calibre, com capacidade reduzida na detecção de alterações de fibras de fino calibre. A biópsia de nervo sural avalia ambos os tipos de fibra sendo a avaliação das fibras de menor calibre feita por histograma, técnica trabalhosa e com custo elevado; HAMMAD, 2007, encontrou nesse exame, alteração na quantidade de fibras de fino calibre em 91% dos pacientes com ELA. A biópsia do nervo sural apresenta o inconveniente de anestesia permanente na porção lateral do pé, risco de formação de neurinoma e impossibilidade de repetição do exame (OCHOA, 1978).

Recentemente tem-se utilizado com frequência cada vez maior a biópsia de pele para avaliação de nervos intradérmicos em neuropatias periféricas, mesmo aquelas

com envolvimento de fibras de grosso calibre (LAURIA et al., 2005, EBENZER et al., 2007).

Essa biópsia de pele pode ser feita em qualquer local do corpo, com o emprego de *punch* descartável, usando técnica estéril, com anestesia local (lidocaína). Comumente é utilizado *punch* de 3 mm, onde não é necessária a realização de sutura local, com cicatrização adequada após 7 dias do procedimento. As complicações são raras, com sangramento, infecção e cicatriz hipertrófica relatadas como as mais comuns (LAURIA et al., 2005, LAURIA et al., 2010). Na biópsia por *punch* podem-se observar, além dos nervos intradérmicos, as demais estruturas como epiderme e derme papilar e reticular (LAURIA et al., 2005). Atualmente a biópsia de pele para estudo de nervo intradérmico tem sido empregada para diagnóstico de neuropatia periférica em várias situações clínicas como para neuropatia diabética, doença de Fabry, neuropatias sensitivas e neuropatias hereditárias (EBENEZER et al, 2007).



## 2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, foi identificada uma mutação em 20q13.33 (locus do gene da proteína VAPB), responsável pela variante ELA familiar tipo 8 (ELA 8), uma forma familiar autossômica dominante de início tardio e progressão lenta que parece afetar igualmente ambos os sexos (NISHIMURA et al., 2004). Essa forma de ELA tem algumas características atípicas, como predomínio proximal da fraqueza, tremor de atitude, câibras intensas e incapacitantes, importante envolvimento da musculatura abdominal - com protusão abdominal - e para vertebral - com cifoescoliose, além de espasmos laríngeos.

Como as úlceras de pressão são incomuns na ELA, tanto esporádica como familiar, e sua fisiopatologia ainda é motivo de discussão, o estudo da pele em um grupo de pacientes brasileiros com ELA 8 de longa evolução pode contribuir para o entendimento das alterações da pele na ELA.

### 3 OBJETIVOS

1. Descrever alterações sensitivas em pacientes com ELA 8, observadas pelo exame neurológico
2. Analisar densidade de fibras intraepidérmicas em biópsia de pele de pacientes com ELA 8.
3. Descrever alterações histológicas da pele de pacientes com ELA 8, analisada quanto à estrutura, glicosaminoglicanos e ferro.
4. Comparar essas alterações com as de indivíduos saudáveis e de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica (não familiar).
5. Correlacionar os achados de exame físico, fibras intradérmicas e histologia de pele nos pacientes com ELA 8

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (protocolo - 149/07) e todos os participantes receberam um informativo por escrito sobre o projeto e assinaram o termo de consentimento informado e esclarecido, concordando com o procedimento e publicação de resultados em revistas científicas.

### 4.1. Casuística

A casuística foi selecionada, de forma consecutiva e prospectiva, no período compreendido entre o mês de outubro de 2008 e maio de 2011, incluindo-se pacientes com ELA 8, ELA esporádica e voluntários sadios (grupo controle).

Critérios de inclusão:

- a) Aceitação da participação no estudo, expressa pela assinatura do termo de consentimento informado e esclarecido,
- b) Teste normal de glicemia em jejum.

Critérios de exclusão:

- a) História de alcoolismo ou ingestão de outras drogas ilícitas,
- b) Exposição a agentes tóxicos como solventes, mercúrio, chumbo e ouro,
- c) Doenças associadas como diabetes, hipotireoidismo, câncer, HIV,
- d) Antecedente de outras doenças do sistema nervoso periférico,
- e) Lesões de pele no local da biopsia em membro inferior,
- f) História de doença vascular periférica.

## **Grupo Controle**

Os voluntários do grupo controle foram selecionados pelo pesquisador entre os médicos, médicos – residentes, estudantes de graduação e pós-graduação, e demais funcionários da UNIFESP–EPM.

Ao longo do estudo, foram incluídos 37 indivíduos, sendo 18 do sexo masculino e 19 do sexo feminino, com idades variando entre 20 a 52 anos com média de  $35,46 \pm 7,49$  anos. Quanto à cor referida, levou-se em consideração a auto-referência utilizada pelo último censo do IBGE de 2010 como branco, pardo e preto. Os membros desse grupo não possuíam queixas sensitivas nem alterações objetivas de sensibilidade no exame neurológico, e não realizaram eletroneuromiografia.

## **Grupos teste - ELA esporádica e ELA 8**

Foram avaliados 48 pacientes portadores de mutação na VAPB. Destes, oito foram retirados do estudo por apresentarem critérios de exclusão fixados no trabalho (um paciente se recusou a colher pele, um paciente tinha diagnóstico de câncer de próstata, dois pacientes tinham hipotireoidismo e quatro pacientes apresentavam glicemia em jejum elevada). Dos 40 pacientes, 20 eram do sexo masculino, com idades variando de 37 a 73 anos, com média de  $52,38 \pm 8,11$  anos. Os pacientes com ELA 8 foram selecionados pelo pesquisador no ambulatório de doenças neuromusculares da UNIFESP-EPM ou em suas regiões de origem, após sucessivas viagens do pesquisador, aos seguintes locais, tendo em vista a dificuldade de locomoção apresentada por esses indivíduos:

- a) Estado do Rio de Janeiro – cidade do RJ: cinco pacientes,
- b) Estado de São Paulo: Campinas, dois pacientes; São Bernardo, três pacientes; SP, cinco pacientes.
- c) Minas Gerais: Juiz de Fora, 14 pacientes; Mutum, sete pacientes; Ouro Preto, dois pacientes; Belo Horizonte, dois pacientes.

Ao longo do estudo, foram incluídos para avaliação 14 pacientes com diagnóstico clínico e eletroneuromiográfico de ELA, sem histórico familiar de qualquer doença neurológica. Sete pacientes eram do sexo masculino, com idades variando de 34 a 73 anos, com média de  $59,64 \pm 11,2$  anos. Os pacientes com ELA esporádica foram selecionados pelo pesquisador no ambulatório de doenças neuromusculares da UNIFESP-EPM, onde todos faziam seguimento médico regular trimestral. Na seleção dos pacientes desse grupo, tentou-se um pareamento por sexo e idade atual em relação ao grupo da ELA 8. Quanto à cor referida, levou-se em consideração a auto-referência utilizada pelo último censo do IBGE de 2010 como branco, pardo e preto (IBGE,2010).

Os critérios de inclusão, além dos referidos acima, foram diagnóstico de ELA, conforme critérios do El Escorial revisados (BROOKS et al., 2000), além de teste genético para ELA 8.

Os critérios de exclusão foram os mesmos usados para o grupo controle, com o adicional de que não foram incluídos pacientes com ELA esporádica de início primariamente bulbar.

#### **4.2. Métodos**

Todos os pacientes foram avaliados pela pesquisadora e submetidos à anamnese e exame neurológico, além de avaliação da pele. A anamnese levou em consideração dados demográficos e clínicos, tais como idade atual dos pacientes, sexo, antecedentes médicos em geral, tempo de início dos sintomas neurológicos (como tremor, câibras/rigidez e fraqueza/atrofia muscular), presença de sintomas bulbares e/ou pseudo bulbares e sintomas sensitivos, uso de respirador ou traqueostomia e capacidade funcional (deambula sem apoio, deambula com apoio, cadeirante, acamado).

O exame neurológico incluiu os seguintes itens:

- avaliação do nível de consciência,
- exame de marcha,

- exame de motricidade em quatro membros e cervical, com graduação da força em cinco níveis, segundo escala de Força Muscular do Medical Research Council (Mendell et al., 1990)

- exame de coordenação motora (testes de funções vestibulares e cerebelares),

- avaliação de tônus e trofismo em quatro membros. Foi ainda avaliada no exame a presença de protrusão abdominal,

- exame dos reflexos superficiais e osteotendinosos profundos,

- o exame de nervos cranianos (I ao XII),

- avaliação da sensibilidade superficial, modalidade de sensibilidade dolorosa, foi realizada com um fio de monofilamento, começando em mãos e pés de forma ascendente. A sensibilidade tátil foi testada com um pedaço de algodão seco da mesma maneira que a sensibilidade dolorosa. A sensibilidade térmica foi testada com tubo de água gelada (4 °C),

- avaliação da sensibilidade profunda foi realizada com um diapasão de 128 Hz em hálux, maléolo lateral, falange terminal do polegar e apófise estilóide do rádio bilateralmente.

No exame cutâneo foram avaliadas a coloração, elasticidade, temperatura, e integridade da pele em regiões distais de pernas, trocanteres, região sacral, cubital e occipital.

### **Eletroneuromiografia**

A ENMG foi solicitada para todos os pacientes da amostra. Devido à grande dispersão espacial dos pacientes e dificuldades de acesso, as mesmas foram realizadas, quando possível, no setor de doenças neuromusculares da UNIFESP- EPM nos pacientes que faziam seguimento nesse serviço, ou em seus respectivos serviços médicos de origem. Todos os exames incluíram o estudo de condução nervosa e eletromiografia.

## Genética

O teste genético foi realizado por meio de colaboração com Os Profs. Dra. Mayana Zatz e Miguel Mitne Neto do Centro de Genoma Humano da USP em todos os pacientes com mutação da VAPB. Em resumo, a técnica se baseia na pesquisa específica da mutação *p.Pro56Ser* em VAPB. O exon 2 do gene da VAP B, onde se localiza a alteração, é amplificado e, posteriormente, é realizada uma digestão com uma enzima de restrição denominada HaeIII, que permite identificar, pelo tamanho do fragmento originado, se naquela amostra existe a alteração ou não (NISHIMURA et al., 2004).

## Biópsia de pele

A biópsia foi realizada em todos os pacientes e controles, sob técnica estéril, utilizando um *punch* descartável (Kolplast®) com 3 mm de diâmetro, após anestesia local da pele com 2 ml de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstrictor (Ariston Indústrias Químicas-Brasil®). O local da biópsia foi a porção lateral distal da perna direita, a oito centímetros acima do maléolo lateral, que devia estar livre de cicatrizes atróficas ou hipertróficas e de hematomas recentes. Após o procedimento, não foi realizada sutura, mas sim curativo compressivo local. Foi checado se houve cicatrização adequada após sete dias do procedimento.

Em cinco pacientes com ELA 8, cinco com ELA Esporádica e cinco controles foi realizada a biópsia com a mesma técnica, mas em ambas as pernas para, além da avaliação imunoistoquímica do nervo intradérmico, realizar avaliação adicional de técnicas histológicas (hematoxilina-eosina, ferro coloidal, azul de alcian).

## Técnica imunoistoquímica do nervo intradérmico

A técnica imunoistoquímica para análise do nervo intradérmico foi realizada no laboratório de doenças neuromusculares da UNIFESP-EPM.

Depois da retirada dos fragmentos de pele, os mesmos foram imediatamente fixados em solução de Zamboni (20 gramas de paraformaldeído acrescidos de 150 ml de solução saturada duplamente filtrada de ácido pícrico e gotas de hidróxido de sódio a 2,5% aquecido a 60 graus Celsius para dissociação do paraformaldeído em

formaldeído) diluída em 1000 ml de tampão fosfato (3,31 gramas de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  e 33,77 gramas de  $\text{NaHPO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  em 1000 ml de água destilada) (STEFANINI et al.,1967). A pele foi mantida nessa solução por 18 horas em osmolaridade de 900 mOsm, pH de 7,3 e temperatura de 4 graus centígrados. A seguir os tecidos foram transferidos para uma solução crioprotetora de sucrose a 10% em tampão fosfato salino- PBS (0,01 M tampão fosfato com 0,15 M NaCl em pH de 7,4) a 4 graus centígrados, sendo realizadas cinco trocas durante 24 horas. As amostras foram então congeladas em gel congelante (Shandon- Cryomatrix) na bandeja do criostato com temperatura de 30 graus centígrados negativos. Dessa forma as amostras eram armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$ . A partir dessas amostras foram obtidos cortes de 15 micrômetros no criostato a 25 graus centígrados negativos (IEC- Minotome Plus). Os cortes foram fixados em lâminas eletricamente carregadas (Biogen®) ou previamente tratadas com silano (Biogen®) e mantidos por no máximo 24 horas a 20 graus centígrados negativos até o processamento imunoistoquímico.

As lâminas com os fragmentos de pele foram retiradas do freezer e colocadas em temperatura ambiente durante 60 minutos para secarem. Foram, posteriormente, incubadas durante 15 minutos com solução bloqueadora de albumina de cavalo (Sigma H1270) diluída a 0,5% em Triton X-100 (Sigma T8787) em tampão PBS a 0,1 M em pH de 7,4 e temperatura ambiente de 22 graus centígrados. A seguir as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal PGP 9,5 (Chemicon AB1761) na diluição de 1:800 em solução bloqueadora descrita acima durante 18 horas em câmara úmida em temperatura ambiente. Após este período as lâminas com os fragmentos foram lavados três vezes durante 5 minutos, com tampão PBS. Foi então utilizado o anticorpo secundário IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Dako F0205), diluído em solução bloqueadora na proporção de 1:80, durante 60 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Após esse período, os fragmentos foram lavados novamente três vezes por 5 minutos cada lavagem, em tampão PBS 0,1 M, e montados em meio especial para fluorescência (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence – Vector H1000) sob lamínula de 4 cm. As lâminas foram estocadas ao abrigo de luz na temperatura de 10 graus centígrados até análise.

Os cortes foram observados em microscópio convencional de epifluorescência (Olympus BX 60) com objetivas de 20x e 40x. A análise quantitativa de fibras nervosas



intraepidérmicas por milímetro de epiderme (densidade linear) foi obtida pela divisão do número total de fibras que atravessaram a membrana basal pelo comprimento da epiderme analisada (em milímetros), conforme previamente descrito (HSIUNG-FEI et al., 2001). Para definição de normalidade na densidade linear de fibras intraepidérmicas foi utilizado o ponto de corte de 3,3 fibras por milímetro de pele, sendo qualquer valor abaixo desse considerado anormal (MOURA et al., 2004).

### **Técnicas histológicas**

As quinze amostras realizadas na porção lateral distal da perna esquerda foram fixadas em formol tamponado a 10%, com pH aproximadamente de 7,2 e encaminhadas ao laboratório de Patologia da UNIFESP –EPM para processamento das técnicas de hematoxilina- eosina, Azul de Alcian e Ferro Coloidal.

### **Hematoxilina-eosina**

As peles foram desparafinizadas e hidratadas, lavadas em água corrente por 3 minutos. Foram a seguir colocadas em solução de hematoxilina por 5 minutos. Após retirada da solução de hematoxilina, foram lavadas em água corrente por 2 minutos e colocadas em solução diferenciadora (álcool – ácido) por 2 vezes em imersão rápida. A seguir foram lavadas em água corrente por 3 a 5 minutos e colocadas em solução amoniacal a 2% por 2 vezes em imersão rápida. Foram então colocadas em solução de eosina amarelada por 5 minutos, após passar em uma sequência de cubas contendo álcool absoluto em imersão rápida para retirada do excesso da solução de eosina. Em seguida colocadas em solução de xilol 4 vezes em imersão rápida, mantendo as lâminas histológicas em cuba de vidro com xilol e realizada a montagem com a utilização de entellan® para obter uma melhor durabilidades das lâminas (MICHALANY, 1998).

### **Azul de Alcian**

As peles foram desparafinizadas e hidratadas. A seguir, foram lavadas em água corrente e colocadas em solução de ácido acético 3% por 5 minutos. Colocadas em solução de azul de Alcian, 100 ml por 30 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir, foram lavadas em água destilada e colocadas em solução de ácido

periódico 5% por 15 minutos. Foram mais uma vez lavadas rapidamente em água destilada 3x e colocadas em reativo de Schiff por 30 minutos. Após nova Lavagem em água corrente por 5 minutos, foram desidratadas, diafanizadas e montadas (MICHALANY, 1998).

### **Ferro Coloidal de Mowry**

As peles foram desparafinizadas e hidratadas até a água destilada. A seguir, foram colocadas durante 3 minutos em solução de Ácido Acético Glacial 12%, submetidas em solução trabalho de Muller por 1 hora. A seguir foram enxaguadas em solução aquosa de ácido acético 12% em 4 etapas, durante 3 minutos cada. As lâminas foram submetidas pela solução de trabalho de Ferrocianeto de Potássio/Ácido Clorídrico por 20 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente por 5 minutos e enxaguadas em água destilada. Após esse processo foram desidratadas e diafanizadas e montadas com resina para análise em microscópio (MICHALANY, 1998).

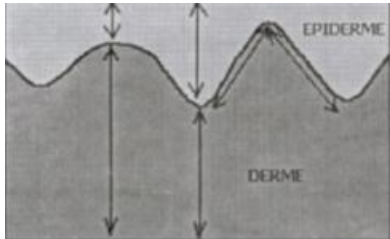
Após processamento histoquímico, todas as lâminas foram analisadas em microscopia óptica, com aumento de 10x (microscópio Nikon® Eclipse 501), fotografadas (programa NIS/elements® F33.00) e após obtenção destas imagens analisadas no programa ImageJ® 1.44p (versão disponível on line gratuita: [imagej.en.softonic.com](http://imagej.en.softonic.com)).

As imagens obtidas das lâminas com colorações de hematoxilina eosina, alcian blue e ferro coloidal foram então analisadas e a área a ser estudada escolhida como especificado a seguir.

Foi realizada medida da espessura da pele, iniciando na epiderme até derme em milímetros. Todas as imagens foram convertidas à escala cinza, como determina o programa ImageJ® e escolhidas as áreas para avaliação de intensidade de coloração.

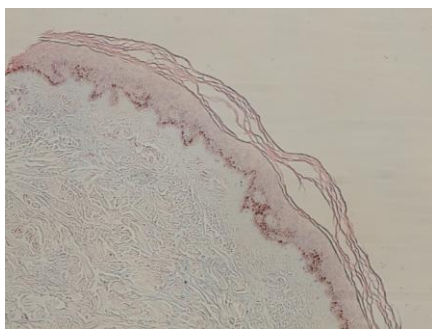
Na coloração por hematoxilina-eosina foram avaliadas as peles quanto à retificação de epiderme e espessura da epiderme. Considerou-se a espessura normal de epiderme entre 0,06 a 0,6 mm, conforme referência (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1998). A epiderme foi medida em 10 locais diferentes, sendo cinco no ápice das papilas e cinco na reentrância delas, sendo medida por toda a extensão de 3

mm do corte histológico, passando-se linhas retas tangentes às saliências e reentrâncias ao longo da superfície, segundo figura 1. Para cada paciente haviam então 10 medidas de espessura de epiderme, sendo usada a média para representar cada paciente.

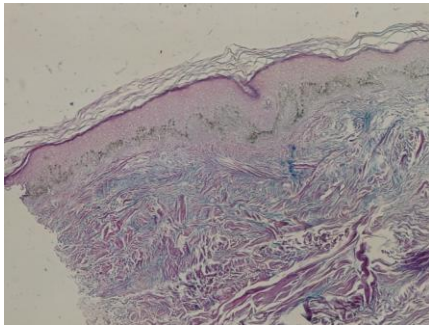


**Figura 1-** esquema de medida da epiderme. A epiderme foi medida em 10 locais diferentes, sendo 5 no ápice das papilas e 5 fora na reentrância delas em toda a extensão de 3 mm da epiderme

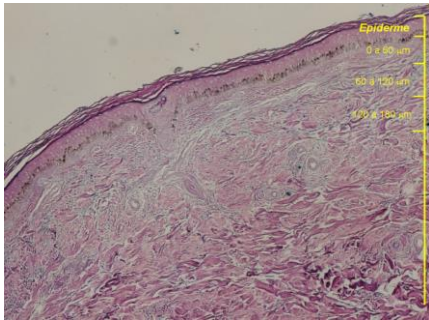
Para a avaliação das colorações ferro coloidal e azul de alcian as 15 lâminas foram fotografadas e, a seguir, foi medida a espessura da derme em milímetros e dividida a derme em três regiões a partir do início da derme; a região 1 ia de 0 a 59 mm, a região 2 de 60 a 120 mm, e a região 3 de 121 a 180 mm. Para cada uma das três regiões, foram feitas cinco aquisições, num total de 15 aquisições por paciente, sendo usada a média para representar cada paciente. Todas as imagens foram transformadas em cor cinza para análise do programa ImageJ® e avaliação do percentual de área corada (figuras 2 e 3). O alcian blue detecta polissacárideos ácidos, como mucopolissacárides e poliglucosaminoglicanos, que aparecem azulados ou esverdeados. O ferro coloidal detecta mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular) que aparecem como azul-esverdeado.



**Figura 2 –** Azul de Alcian



**Figura 3** – Ferro coloidal



**Figura 4** – Fotomicrografia em aumento de 10x, corado por hematoxilina-eosina, onde à direita observa-se esquema da medida de espessura da derme

### **Avaliação estatística**

Os dados foram tabulados e expressos como medidas centrais e de dispersão, quando contínuos ou semi-contínuos, e como percentagens, quando categóricos. Foi feita a análise de distribuição dos dados pelo método de distância K-S. Dados gaussianos foram expressos como média e desvio padrão; dados não gaussianos foram expressos como mediana e 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> percentis. Para diferenças entre grupos foram usados os testes de qui-quadrado para dados categóricos, bem como teste t não pareado ou Mann-Whitney e Anova ou Kruskal-Wallis, conforme os dados contínuos/semi-contínuos fossem gaussianos ou não. Os testes de coeficiente R de correlação de Spearman ou Pearson foram utilizados para verificação de associações. Foi considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ . Os testes foram executados com os programas estatísticos (Graphpad Prism versão 5.03 disponível online gratuito).

Para a valorização do coeficiente de correlação ( $r$ ), foi empregada a classificação conforme a tabela 2 abaixo (VIEIRA, 2004). Foram valorizadas as correlações com valor de  $r$  a partir de nível moderado.

**Tabela 2-** Classificação das correlações de acordo com o coeficiente de correlação(r):

<b>Coeficiente de correlação</b>	<b>Classificação</b>
<b>( r )</b>	
0,0 - 0,1	Muito baixa
0,1 - 0,3	Baixa
0,3 - 0,5	Moderada
0,5 - 0,7	Alta
0,7 - 0,9	Muito alta
0,9 - 1,0	Quase perfeita

## **5 RESULTADOS**

### **5.1. Casuística**

Foram incluídos nesta amostra 91 indivíduos, sendo 37 controles, 40 diagnosticados como ELA 8 e 14 como ELA Esporádica.

### **5.2. Controles**

Os dados demográficos desse grupo estão resumidos na tabela 3 e listados com detalhe no anexo (tabela 26). Havia predomínio de pacientes na quarta década, mulheres e brancos. Não foram coletados os dados referentes a tabagismo.

**Tabela 3.** Dados demográficos resumidos e comparação dos grupos controle, ELA esporádica e ELA 8 relacionados por cor, sexo, idade expressa em anos e tabagismo

	<b>Controles</b>	<b>ELA esporádica</b>	<b>ELA 8</b>	<b>p</b>
	<b>n=37</b>	<b>n=14</b>	<b>n=40</b>	
<b>Média de idade (anos)</b>	35,46 ± 7,4 anos	59,64± 11,2 anos	52,38±8,1 anos	p<0,0001* (Anova)
<b>Sexo</b>				
<b>Feminino</b>	19 (51,4%)	7 (50%)	20 (50%)	p=ns (X <sup>2</sup> )
<b>Masculino</b>	18 (48,6%)	7 (50%)	20 (50%)	
<b>Cor</b>				
	Branco	Branco	Branco	p<0,05 (brancos grupo controle vs brancos ELA8) (FISHER)
	20 (54,1%)	9 (64,3%)	32 (80%)	
	Pardo	Pardo	Pardo	
	5 (13,5%)	4 (28,6%)	8 (20 %)	
	Preto	Preto	Preto	
	12 (32,4%)	1 (7,1%)	0 (0%)	
<b>Tabagismo</b>		4 (28,6%)	10 (25%)	p=ns (X <sup>2</sup> )

\* grupo controle significativamente mais jovem que ELA esporádica e ELA8.

### 5.3. ELA esporádica

Os dados demográficos desse grupo estão listados de forma resumida na tabela 3 e listados com detalhe no anexo (tabela 27). Havia predomínio de pacientes na sexta década, com distribuição igualitária entre os sexos, com predomínio de brancos. Um paciente (7,1%) estava abaixo de 40 anos. Havia quatro fumantes nesse grupo.

Os dados clínicos desse grupo estão listados de forma resumida na tabela 4 e com detalhes na tabela 28 do anexo. Nos quatorze pacientes desse grupo, a idade do início do sintoma fraqueza foi em média de  $55,5 \pm 11,2$  anos; o tempo de doença, considerando a fraqueza, variou de 1 a 15 anos, com mediana de 2,5 anos (1,75-4,25 anos). O sintoma câibra estava presente em seis pacientes com média de idade de início de  $60,5 \pm 10,2$  anos, com o tempo mediano de doença, considerando a câibra, de dois anos (1 -2,25 anos).

**Tabela 4.** Dados clínicos de pacientes com ELA esporádica

Idade início fraqueza (média; n=14)	55,5 $\pm$ 11,2 anos
Tempo fraqueza (mediana)	2,5 anos
Idade início câibra (média; n=6)	60,5 $\pm$ 10,2 anos
Tempo câibra (mediana)	2 anos
El Escorial	
Provável+ auxílio laboratorial	4 (28,6%)
Provável	1 (7,1%)
Definida	9 (64,3%)

Segundo os critérios do El Escorial revisados, os pacientes foram classificados como formas provável com auxílio laboratorial (4 pacientes, 28,6%), provável (1 paciente, 7,1%) e definida (9 pacientes, 64,3%); nos quatro pacientes com forma provável com auxílio laboratorial, o apoio diagnóstico foi fornecido pela ENMG, mostrando envolvimento do neurônio motor inferior em regiões clinicamente não afetadas. Não houve correlação entre a idade do início da fraqueza e a classificação no



El Escorial ( $p=ns$ ; teste de correlação de Spearman), bem como quanto ao tempo de fraqueza com El escorial ( $p=ns$ ; teste de correlação de Spearman).

Não houve diferença entre a idade do início de sintomas de câibra com o El escorial ( $p=ns$ ; teste de correlação de Spearman) e tempo de sintomas de câibra com El escorial ( $p=ns$ ; teste de correlação de Spearman).

Em relação ao exame neurológico no momento da coleta da biópsia de pele, os dados positivos estão listados nas tabelas 5 e 6. Em resumo, nesse grupo, não havia nenhum paciente com alterações do nível ou conteúdo da consciência, linguagem, praxias, gnosias, facies, coordenação, alteração neurovegetativa, sinais meníngeos. A fraqueza e a atrofia muscular foram as alterações observadas em todos os pacientes desse grupo, com frequência decrescente dos seguintes sinais: fasciculações, hiperreflexia, hipotonia, outros sinais piramidais, alteração de nervos cranianos, hipertonia, hiporreflexia, alteração sensitiva profunda e superficial.

**Tabela 5.** Exame neurológico dos pacientes com ELA esporádica e com ELA 8

	ELA esporádica	ELA 8	p (Fisher ou $X^2$ )
	n=14	n =40	
Fraqueza muscular	14 (100%)	36 (90%)	ns (Fisher )
Hipotonia	10 (71,4%)	25 (62,5%)	p =ns ( $X^2$ )
Hipertonia	7 (50%)	1 (2,5%)	p <0,0001 ( $X^2$ )
Fasciculações	13 (92,8 %)	27 (67,5%)	p =ns ( $X^2$ )
Atrofia muscular	14 (100%)	30 (75%)	p <0,05 ( $X^2$ )
Hiporreflexia	7 (50%)	29 (72,5%)	p =ns ( $X^2$ )
Hiperreflexia	13 (92,8%)	12 (40%)	p <0,0001 ( $X^2$ )
Outros sinais piramidais (Hoffman, Babinski)	10 (71,4%)	3 (7,5%)	p <0,0001 ( $X^2$ )
Tremor	0	33( 82,5%)	-
Alteração sensitiva profunda	4 (28,6%)	10 (25%)	p=ns ( $X^2$ )
Alteração sensitiva superficial	2 (14,3%)	8 (20%)	p =ns ( $X^2$ )
Nervos cranianos	8 (57,1%)	12 (40%)	p =ns( $X^2$ )

**Tabela 6.** Exame de força muscular em pacientes ELA esporádica e ELA 8

Força muscular	ELA esporádica	ELA 8	p (Mann Whitney)
	n =14	n= 40	
Força proximal MS	Mediana 4 [2-5]	Mediana 4 [3,5-5]	p=ns
0	0	1 (2,5%)	
1	0	0	
2	4 (28,57%)	7 (17,5%)	
3	1 (7,14%)	2 (5%)	
4	5 (35,71%)	15 (37,5%)	
5	4 (28,57%)	15 (37,5%)	
Força distal MS	Mediana 4 [3-4]	Mediana 5 [4-5]	p<0,05
0	0	0	
1	1 (7,14%)	3 (7,5%)	
2	5 (35,71%)	6 (15%)	
3	6 (42,85%)	6 (15%)	
4	2 (14,28%)	25 (62,5%)	
5			
Força proximal MI	Mediana 4 [2,5-5]	Mediana 4 [3-4]	p=ns
0	0	1 (2,5%)	
1	0	1 (2,5%)	
2	3 (21,42%)	6 (15%)	
3	2 (14,28%)	7 (17,5%)	
4	5 (35,71%)	19 (47,5%)	
5	4 (28,57%)	6 (15%)	
Força distal MI	Mediana 4 [3,5-4,5]	Mediana 5 [4-5]	p=ns
0	0	0	
1	0	0	
2	1 (7,14%)	3 (7,5%)	
3	2 (14,28%)	6 (15%)	
4	6 (42,85%)	10 (25%)	
5	5 (35,71%)	21 (52,5%)	

Graduação de força de 0 a 5: 0- sem contração muscular; 1- contração visível sem produzir movimento; 2- movimento linear; 3- não vence gravidade; 4- vence gravidade mas não examinador; 5- normal. MS: membros superiores; MI: membros inferiores

#### 5.4. ELA 8

Os dados demográficos de pacientes com ELA 8 estão listados de forma resumida na tabela 3 e estão listados com detalhes na tabela 29 do anexo. Havia predomínio de pacientes na sexta década, com distribuição igualitária entre os sexos, com predomínio de brancos. Havia dez fumantes nesse grupo.

Os dados clínicos desse grupo estão listados de forma resumida na tabela 7 e com detalhes na tabela 30 do anexo. Nos quarenta pacientes desse grupo, 36 pacientes referiam sintomas de fraqueza, com a média de idade do início do sintoma fraqueza de  $46,28 \pm 5.3$  anos, com mínimo de 33 e máximo de 58 anos; o tempo de doença com a manifestação de fraqueza variou de 1 a 20 anos, com mediana de 6 anos (4-10 anos). Ao considerar o início da doença como a câibra, a média de idade foi de  $44,28 \pm 5,9$  anos com mínimo de 33 e máximo de 58 anos; o tempo de doença com o sintoma câibra variou de 1 a 30 anos, com mediana de 9 anos (5 -10 anos). Já ao considerar o início da doença como o tremor, a média de idade foi de  $40,27 \pm 13,81$  anos, com mínimo de 10 e máximo de 60 anos; o tempo de doença com o sintoma tremor apresentava mediana de 8 anos (3,5-10,5 anos).

Dos oito pacientes avaliados e não incluídos neste trabalho, haviam seis mulheres, com características clínicas semelhantes, com sintoma câibra e tremor como mais frequentes no começo da doença.

**Tabela 7** Dados clínicos de pacientes com ELA 8

<b>Idade início fraqueza (média; n=36)</b>	46,28 $\pm$ 5,3 anos
<b>Tempo fraqueza (mediana)</b>	6 anos
<b>Idade início câibra (média; n=36)</b>	44,28 $\pm$ 5,9 anos
<b>Tempo câibra (mediana)</b>	9 anos
<b>Idade início tremor (média; n=33)</b>	40,27 $\pm$ 13,81 anos
<b>Tempo tremor (mediana)</b>	8 anos
<b>EI Escorial</b>	
<b>Possível</b>	7(17,5%)
<b>Provável+ auxílio laboratorial</b>	14 (35%)
<b>Provável</b>	6 (15%)
<b>Definida</b>	13 (32,5%)

Segundo os critérios do EI Escorial revisados os pacientes foram classificados como formas possível (7 pacientes, 17,5%), provável com auxílio laboratorial (14 pacientes, 35%), provável (6 pacientes, 15%) e definida (13 pacientes, 32,5%); nos quatorze pacientes com forma provável com auxílio laboratorial, o apoio diagnóstico foi fornecido pela ENMG, mostrando acometimento de NMI em regiões clinicamente não afetadas. Nessa classificação, não foi considerado o resultado da avaliação genética.

Houve moderada correlação inversa entre a classificação do EI Escorial e a idade de início dos sintomas câibra ( $p < 0,01$ ;  $r = -0,43$ , teste de correlação de Spearman) e fraqueza ( $p < 0,01$ ;  $r = -0,45$ , teste de correlação de Spearman). Não houve correlação entre a idade do início do tremor e a classificação no EI Escorial ( $p$ : ns; teste de correlação de Spearman).

Houve moderada correlação entre o EI Escorial e o tempo de fraqueza e ( $p < 0,01$ ;  $r = -0,49$ , teste de correlação de Spearman), o tempo de câibras ( $p < 0,05$ ;  $r = -0,36$ , teste de correlação de Spearman), não havendo entretanto correlação estatística com o tempo de tremor ( $p$ : ns; teste de correlação de Spearman).

Em relação ao exame neurológico no momento da coleta da biópsia de pele, os dados positivos estão listados nas tabelas 5 e 6. Em resumo, nesse grupo, não havia nenhum paciente com alterações do nível ou conteúdo da consciência, linguagem, praxias, gnosias, facies, alteração neurovegetativa, sinais meníngeos.

Nesse grupo, a fraqueza e o tremor predominavam (90 % e 82,5% respectivamente), com frequência decrescente dos seguintes sinais: atrofia, hiporreflexia, fasciculações, hipotonia, hiperreflexia, alteração de nervos cranianos, alteração sensitiva profunda e superficial, outros sinais piramidais e hipertonia.

### **5.5. Dados demográficos – comparações entre 3 grupos**

Em relação ao sexo, não houve diferença significativa entre os três grupos ( $p=ns$ ; teste  $\chi^2$ , tabela 3).

Quando comparadas as idades atuais dos três grupos, o grupo controle era significativamente mais jovem que os dois grupos com ELA ( $p<0,0001$ ; ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Em relação à cor da pele referida pelo paciente, não houveram diferenças significantes entre os grupos de ELA 8 e ELA esporádica, nem entre os grupos ELA esporádica e controle quando comparados o número de brancos com a soma do número de pardos mais pretos ( $p=ns$ ; teste de Fisher). Entretanto, havia significativamente mais pacientes com auto referência de cor branca do que com a soma do número de pardos mais pretos no grupo ELA 8 quando comparado a controles ( $p<0,05$ ; teste de Fisher).

Quatro e 11 pacientes, respectivamente, dos grupos ELA esporádica e ELA 8, referiam tabagismo atual ou prévio ao início da doença, não havendo diferença estatística quando comparada a frequência do tabagismo nesses dois grupos ( $p=ns$ ;  $\chi^2$ ).

### **5.6. Dados clínicos – comparação entre os dois grupos de pacientes com ELA**

Com relação à idade atual os pacientes com ELA 8 foram significativamente mais jovens que os de ELA esporádica (tabela 8).

**Tabela 8.** Dados clínicos- grupo ELA esporádica versus grupo ELA8: idade/tempo doença referidos pelo paciente

	ELA esporádica	ELA 8	P
	(n=14)	(n=40)	
Idade atual (média)	59,64 $\pm$ 11,2 anos	52,38 $\pm$ 8,1 anos	p<0,05 (teste t não pareado)
Idade início de fraqueza (média)	55,5 $\pm$ 11,2 anos	46,3 $\pm$ 5,3 anos	p<0,0001 (teste t não pareado)
Idade início de câibra(média)	60,5 $\pm$ 10,2 anos	44,28 $\pm$ 5,9 anos	p<0,0001 (teste t não pareado)
Idade início de tremor	-	40,27 $\pm$ 13,8 anos	-
Tempo de fraqueza (mediana)	2,5 anos	6,0 anos	p<0,05 (Mann Whitney)
Tempo de câibra (mediana)	2,0 anos	9,0 anos	p<0,0001(Mann Whitney)
Tempo de tremor (mediana)	-	8,0 anos	

Os pacientes com ELA 8 iniciaram os sintomas de fraqueza e câibras numa idade significativamente mais precoce que os pacientes com ELA esporádica (em média nove e 16 anos, respectivamente). Enquanto que na ELA esporádica a queixa de câibra em média sucedeu a fraqueza em cinco anos, na ELA 8 a queixa de câibra precedeu a fraqueza em dois anos. A idade de início de tremor na ELA esporádica não foi calculado, pois nenhum paciente deste grupo referiu este sintoma. Esses dados clínicos encontram-se na tabela 8.

Em relação ao número de pacientes com queixa dos sintomas tremor/fraqueza/câibra ao longo da doença, observou-se que não havia diferença significativa em relação ao número de pacientes com fraqueza nos dois grupos (p=ns;

X<sup>2</sup>). Entretanto, houve significativamente mais pacientes com câibras no grupo com ELA 8 que no grupo com ELA esporádica e não havia pacientes com tremor no grupo de ELA esporádica versus a maioria dos pacientes com ELA 8 (tabela 8).

Não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto à presença de queixas sensitivas ou bulbares ( $p=ns$ ; X<sup>2</sup>) e nem quanto ao emprego de ventilação não invasiva e traqueostomia ( $p=ns$ ; X<sup>2</sup>) (tabela 9).

Em nenhum paciente de ambos os grupos o sintoma bulbar foi a queixa inicial. As queixas bulbares mais comuns de ambos os grupos foram a disfonia seguida por disfagia. Em ambos os grupos as alterações ocorreram nos nervos cranianos IX,X,XI e XII.

**Tabela 9.** Dados clínicos- grupo ELA esporádica versus grupo ELA 8: sintomas referidos pelo paciente- fraqueza/câibra/tremor/queixa sensitiva/suporte ventilatório/traqueostomia

	ELA esporádica (n=14)	ELA8 (n=40)	p (X <sup>2</sup> )
<b>Fraqueza</b>	14 (100%)	36 (90%)	$p=ns$
<b>Tremor</b>	0 (0%)	33 (82,5%)	-
<b>Câibra</b>	6 (42,9%)	36 (90%)	$p<0,001$
<b>Sintomas sensitivos</b>	8 (57,1%)	14 (35%)	$p=ns$
<b>Sintomas bulbares</b>	6 (42,9%)	12 (30%)	$p=ns$
<b>Ventilação não invasiva</b>	5 (37,5%)	9 (22,5%)	$p=ns$
<b>Traqueostomia</b>	2 (5%)	1 (7,1%)	-

A tabela 10 apresenta a correlação entre idade/tempo de fraqueza/traqueostomia e o uso de traqueostomia nos dois grupos. O pequeno número de pacientes não permitiu a análise estatística, mas parece que os pacientes com ELA



8 realizaram a traqueostomia mais jovens, porém com mais tempo de doença. Todos os pacientes traqueostomizados estavam em uso de BiPAP.

**Tabela 10.** Correlação entre tempo/idade de início de fraqueza, expressa em anos, e uso de traqueostomia em pacientes ELA esporádica e ELA 8

	ELA esporádica	ELA 8
	n=1(7,1%)	n= 2 (5%)
Idade traqueostomia	67 anos	61,5 $\pm$ 1,4 anos
Tempo traqueostomia	5 anos	4 anos
(mediana)		
Tempo atual de doença (fraqueza)	12 anos	15 anos
(mediana)		
Tempo doença no início traqueostomia	7 anos	11 anos
(mediana)		
Idade início doença (fraqueza)	60 anos	50 $\pm$ 5,65 anos

A tabela 11 apresenta a correlação entre idade/tempo de fraqueza/BiPAP e o uso de BiPAP nos dois grupos. Os pacientes com ELA8 iniciaram uso de BiPAP significativamente mais jovens quando comparados aos pacientes com ELA esporádica, bem como seus sintomas de fraqueza se iniciaram em idade significativamente mais precoce. Não houve diferença quanto ao tempo de uso de BiPAP nem quanto ao tempo de doença no momento da indicação da ventilação não invasiva.

**Tabela 11.** Correlação entre tempo/idade de início de fraqueza, expressa em anos, e uso de ventilação não invasiva em pacientes ELA esporádica e ELA 8

	ELA esporádica	ELA 8	p
	n=5 (35,7%)	n=9 (22,5%)	
<b>Idade BiPAP</b>	65,2±5,4 anos	52,57±6,65 anos	p<0,01 (teste t não pareado)
<b>Tempo BiPAP</b>	2,80±2,04 anos	3,66±2,44 anos	p=ns (teste t não pareado)
<b>Tempo atual de doença (fraqueza)</b>	4 anos	9 (quartis:6,5-11,5) anos	p=ns (Mann Whitney)
<b>(mediana)</b>			
<b>Tempo doença no início BiPAP</b>	5 anos	7 (quartis:3-8,5) anos	p=ns (Mann Whitney)
<b>(mediana)</b>			
<b>Idade início doença (fraqueza)</b>	61,8±9,14 anos	46,89 ±5,15 anos	P< 0,01 (teste t não pareado)

Não houve diferença entre tempo de doença (considerando fraqueza) nos pacientes que usavam e não usavam BiPAP no grupo da ELA esporádica, enquanto na ELA 8 os pacientes em uso de BiPAP tinham significativamente mais tempo de doença dos que os que não usavam. Ao considerar uso de BiPAP e sexo, não houve diferença em nenhum dos dois grupos (tabela 12).

**Tabela 12.** Correlação entre uso de BiPAP e tempo de doença (considerando fraqueza)/sexo nos grupos ELA esporádica e ELA 8

	Uso de BiPAP	Sem uso de BiPAP	P
Tempo doença ELA esporádica (mediana)	n=5 4 anos	n=9 2 anos (quartis: 1-4)	p=ns (Mann Whitney)
Tempo doença ELA 8 (mediana)	n=9 9 anos (quartis:6,5-11,5)	n=31 5 anos (quartis: 2-9,0)	p<0,05 (Mann Whitney)
Sexo ELA: Homens	n=1	n=6	p=ns ( $X^2$ )
Mulheres	n=4	n=3	
Sexo ELA 8: Homens	n=6	n=14	p=ns ( $X^2$ )
Mulheres	n=3	n=17	

Ao avaliar o grau de independência (tabela 13), classificado como 1 a 4 (1: independente, 2: apoio unilateral ou bilateral, 3: restrito à cadeira de rodas e 4: restrito ao leito), não houve diferença significativa entre os grupos ELA esporádica e ELA 8, mediana 2 (quartis:1-3) versus mediana 2 (quartis:1-3); p=ns; Mann Whitney). Também não havia diferença entre o tempo de uso de cadeira de rodas entre os dois grupos (Tabela 13). Só havia um paciente restrito ao leito, pertencente ao grupo ELA 8.

**Tabela 13.** Avaliação de marcha de pacientes com ELA esporádica e ELA 8

<b>Marcha</b>	<b>ELA esporádica</b>	<b>ELA 8</b>	<b>P</b>
	<b>(n=14)</b>	<b>(n=40)</b>	
<b>Independente</b>	n=4 (28,6%)	n=17 (42,5%)	p=ns $\chi^2$
<b>(grau1)</b>			
<b>Apoio (grau 2)</b>	n=4 (28,6%)	n=7 (17,5%)	p=ns $\chi^2$
<b>Cadeira de rodas</b>	n=6 (42,8%)	n=15 (37,5%)	p=ns $\chi^2$
<b>(grau 3)</b>			
<b>Leito (grau4)</b>	-	n=1 (2,5%)	p=ns $\chi^2$
<b>Tempo de Cadeira de rodas</b>	2,8 $\pm$ 2,3 anos	3,8 $\pm$ 1,69	p=ns teste T não pareado
<b>Tempo Leito</b>	-	4 anos	-

Houve significativamente mais pacientes com sinais piramidais no grupo de ELA esporádica que no grupo de ELA 8 (tabela 14).

**Tabela 14.** Dados clínicos- grupo ELA esporádica versus grupo ELA 8: sinais ao exame neurológico

	ELA esporádica	ELA 8	p (X <sup>2</sup> )
	n=14	n=40	
<b>Sensibilidade superficial</b> (hipoestesia em bota)	2 (14,3%)	8 (20%)	p=ns
<b>Sensibilidade profunda</b> (hipopalestesia MI)	4 (28,6%)	10 (25%)	p=ns
<b>Sinais piramidais</b>	13 (92,9%)	18 (45%)	p<0,05
<b>Tremor</b>	-	33 (82,5%)	-

Na análise do EI Escorial, foram excluídos os pacientes com forma possível do grupo ELA 8, pois esses pacientes a priori foram excluídos do estudo no grupo da ELA esporádica. Assim, não houve diferença na frequência de pacientes com formas definida, provável ou provável com auxílio laboratorial entre os grupos Ela esporádica e ELA 8 (Tabela 15).

**Tabela 15.** Correlação entre EL Escorial e ELA esporádica e ELA 8

	ELA esporádica	ELA 8	p (X <sup>2</sup> )
<b>EI Escorial</b>			
<b>Possível</b>	-	7(17,5%)	(não calculado)
<b>Provável + auxílio laboratorial</b>	4 (28,6%)	14 (35%)	ns
<b>Provável</b>	1 (7,1%)	6 (15%)	ns
<b>Definida</b>	9 (64,3%)	13 (32,5%)	ns

### 5.7. Dados clínicos –Análise intragrupo de pacientes com ELA 8:

Foram realizadas análises intragrupo naqueles pacientes diagnosticados como ELA 8, para verificar a influência do sexo na manifestação clínica, não sendo encontradas diferenças entre os parâmetros analisados (tabelas 16, 17 e 18).

**Tabela 16 .** Dados clínicos de pacientes com ELA 8 quando comparados os sexos

	Sexo feminino	Sexo masculino	P
	n=20	n=20	
<b>Idade atual</b>	51,10±8,58 anos	53,65±7,63 anos	p=ns (teste T não pareado)
<b>Idade início fraqueza</b>	45,32±5,48 anos n=19 (95%)	47,24±5,2 anos n=17 (85%)	p=ns (teste T não pareado)
<b>Tempo fraqueza (mediana)</b>	5 anos (quartis:3-10,5)	8 anos (quartis:5,5-10,5)	p=ns (Mann Whitney)
<b>Idade início câibra</b>	42,88±6,2 anos n=17(85%)	43,15±11,47 anos n=19 (95%)	p=ns ( teste T não pareado)
<b>Tempo câibra (mediana)</b>	6 anos (quartis:3,5-10)	9 anos (quartis:6,5-11)	p=ns (Mann Whitney)
<b>Idade início tremor</b>	39,31±13,80 anos n=16 (80%)	41,29±14,26 anos n=17 (85%)	p=ns ( teste T não pareado)
<b>Tempo tremor (mediana)</b>	6 anos (percentis:3-15)	9 anos (percentis:5-10,5)	p=ns (Mann Whitney)
<b>EI Escorial (mediana)</b>	3 anos (percentis:2-3)	2,5 anos (percentis:1-3)	p=ns (Mann Whitney)
<b>Possível</b>	4 anos (20%)	3 anos (15%)	p=ns ( $X^2$ )
<b>Provável + auxílio laboratorial</b>	7 anos (35%)	7 anos (35%)	p=ns ( $X^2$ )
<b>Provável</b>	5 anos ( 25%)	1 ano (5%)	p=ns (Fisher's)
<b>Definida</b>	4 anos (20%)	9 anos (45%)	p=ns ( $X^2$ )
<b>Uso de BIPAP</b>	3 anos (15%)	6 anos (30%)	p=ns ( $X^2$ )

\* Idade expressa em anos. Na análise do EI Escorial, cada um dos quatro subgrupos foi testado contra a soma dos três restantes.

**Tabela 17.** Exame neurológico ELA 8 - comparativa entre os sexos

	Sexo feminino	Sexo masculino	p (Fisher ou $X^2$ )
	n=20	n=20	
Fraqueza muscular	19 (95%)	17 (85%)	ns ( $X^2$ )
Hipotonia	11 (55%)	14 (70%)	ns ( $X^2$ )
Hipertonia	1 (5%)	0 (0%)	
Fasciculações	12 (60%)	15 (75%)	ns ( $X^2$ )
Atrofia muscular	13 (65%)	17 (85%)	ns ( $X^2$ )
Hiporreflexia	12 (60%)	17 (85%)	ns ( $X^2$ )
Hiperreflexia	6 (30%)	6 (30%)	ns ( $X^2$ )
Outros sinais piramidais (Hoffman, Babinski)	2 (10%)	1 (5%)	ns (Fisher)
Tremor	16 (80%)	17 (85%)	ns ( $X^2$ )
Alteração sensitiva profunda	4 (20%)	5 (25%)	ns ( $X^2$ )
Alteração sensitiva superficial	4 (20%)	4 (20%)	ns ( $X^2$ )
Nervos cranianos	4 (20%)	9 (45%)	ns ( $X^2$ )

**Tabela 18.** Escala funcional de marcha quando comparado ao sexo na ELA 8 (%)

	Masculino	Feminino	p (X <sup>2</sup> )
	(n=20)	(n=20)	
<b>Independente</b>	7 (35%)	10 (50%)	Ns
<b>Apoio</b>	4 (20%)	3 (15%)	Ns
<b>Cadeira</b>	9 (45%)	6 (30%)	Ns
<b>Leito</b>	0	1 (5%)	

## 5.8. Avaliação sensitiva

### a) Quadro clínico

Com relação a queixas sensitivas, 22 pacientes com ELA referiam estes sintomas (oito pacientes no grupo ELA esporádica e 14 pacientes no grupo ELA 8). Os padrões de sensibilidade descritos pelos pacientes foram hipoestesia em bota (três no grupo ELA esporádica e nove no ELA 8), bota e luva (um no grupo ELA esporádica e quatro no ELA 8), luva (um paciente no grupo ELA 8) e outras queixas (grupo ELA esporádica: um paciente com hiperalgesia em pernas bilateralmente, e um paciente com hipoestesia em região dorsal interescapular; grupo ELA 8: um paciente com hipoestesia em hálux direito, um paciente com hipoestesia em face lateral de coxas). Não houve diferença significativa entre os grupos de ELA esporádica e ELA 8 quanto às queixas sensitivas (  $p=ns; X^2$ ). Tabela 9 e 14.

Nos 22 pacientes com queixa sensitiva de ambos os grupos (tabela 19), os pacientes com ELA esporádica apresentavam idade de início da fraqueza e da câibra significativamente maior que os com ELA 8, não existindo essa diferença no tempo de fraqueza e no tempo de câibra.



**Tabela 19.** Queixa sensitiva comparada à idade/tempo de início de sintomas de fraqueza, câibra e tremor em pacientes com ELA esporádica e ELA 8

Pacientes com queixa sensitiva	ELA esporádica (n=14)	ELA 8 (n=40)	P
n=22	8 (57,1%)	14 (35%)	ns ( $X^2$ )
Média idade início fraqueza	56,75 $\pm$ 8,27 anos (n=8)	47,29 $\pm$ 6,94 anos (n=14)	p<0,05 (teste T não pareado)
Tempo fraqueza (mediana)	2 anos (quartis:1-7,5)	7 anos (quartis:2,5-11)	p=ns (Mann Whitney)
Média Idade início câibra	58,4 $\pm$ 9,8 anos n=5 (35,7%)	45,5 $\pm$ 6,0 anos n=12 (30%)	p<0,05 (teste T não pareado)
Tempo câibra (mediana)	2 anos (quartis:1-7,5)	8,5 anos (quartis:3,5-10)	p=ns (Mann Whitney)
Média Idade início tremor	-	39,94 $\pm$ 13,5 anos n=13 (92,9%)	
Tempo tremor (mediana)	-	8 anos (quartis:3,5-10)	

Não houve diferença significativa entre os grupos ELA esporádica e ELA 8 quanto à frequência da presença de sinais sensitivos objetivos, tanto na modalidade superficial quanto na profunda (tabela 14). As queixas sensitivas (tabela 9) foram mais frequentes que as alterações objetivas no exame da sensibilidade superficial. Na ELA esporádica e na ELA 8, as alterações objetivas de sensibilidade superficial foram encontradas em pacientes que já possuíam alterações da sensibilidade profunda; mas alterações da sensibilidade profunda foram encontradas sem alteração da superficial.

No grupo ELA 8, 14 pacientes apresentavam queixa sensitiva; todos esses pacientes apresentavam queixa de fraqueza associada. No subgrupo com queixa sensitiva, não houve diferença entre idade de início e tempos de fraqueza/câibra/tremor/uso de BiPAP dos homens em relação às mulheres (tabela 20).

**Tabela 20.** ELA 8 - subgrupo com queixa sensitiva: idade de início e tempos de fraqueza/cãibra/tremor/uso de BiPAP dos homens em relação às mulheres

Pacientes com queixa sensitiva	Sexo feminino	Sexo masculino	P
N= 14	9 (45%)	5 (25%)	ns ( $X^2$ )
Média idade início fraqueza	42,22±6,70 anos	49,20±6,14 anos	p=ns ( teste T não pareado)
Tempo fraqueza (mediana)	6 anos (quartis:3-13)	8 anos	p=ns (Mann Whitney)
Média Idade início câibra	34±20,09 anos	47,4±4,03 anos	p=ns ( teste T não pareado)
Tempo câibra (mediana)	8 anos (quartis:2-14)	9 anos	p=ns (Mann Whitney)
Média Idade início tremor	43,22±12,78 anos	39±20,03 anos	p=ns ( teste T não pareado)
Tempo tremor (mediana)	6 anos (quartis:2,5-9)	9,5 anos	p=ns (Mann Whitney)
BiPAP	3 anos (33%)	2 anos (40%)	p=ns ( $X^2$ )
Tempo utilização BiPAP (mediana)	3 anos	4 anos	-

## b) Eletroneuromiografia

A ENMG foi realizada em todos os pacientes com ELA esporádica e ELA 8, avaliados os estudo de condução nervosa e sensitiva. Como mencionado anteriormente, devido à grande dispersão temporal dos pacientes e dificuldade de acesso, os exames foram realizados no setor de doenças neuromusculares da UNIFESP-EPM ou nos seus respectivos serviços médicos de origem, com exames realizados em até 6 meses da avaliação clínica e biópsia de pele. Nesses dois grupos, as velocidades de condução motora e sensitiva pela ENMG foram normais.

## c)Pele

### 1. Avaliação clínica

Na avaliação de pele dos pacientes de ambos os grupos, não foram observadas alterações como úlceras de decúbito, alterações de coloração ou elasticidade da pele.

### 2. Técnicas histológicas - comparações entre 3 grupos

A medida individual da espessura da epiderme estava entre os valores considerados normais ( $59,0 \pm 6,0 \mu\text{m}$ . JUNQUEIRA e CARNEIRO,1998) para todos pacientes do grupo controle, mas estava diminuída em três pacientes do grupo ELA esporádica e dois da ELA 8. Apesar da tendência da média da espessura da epiderme ser mais fina no grupo de ELA esporádica, não houve diferença significativa entre as médias da espessura de epiderme dos grupos controle, ELA esporádica e ELA 8 ( $p=\text{ns}$ , Anova) (tabela 21). Entretanto, quando os valores da espessura foram normalizados pela idade, a média da espessura de epiderme de pacientes com ELA esporádica foi significativamente menor que nos controles ( $p<0,01$ , Anova com pós-teste Bonferroni) (tabela 22). Em relação à coloração do azul de alcian, para detecção de polissacárides, havia significativamente menos marcação na pele dos pacientes com ELA 8 do que nos controles (tabela 21). Na coloração do ferro coloidal não houve diferença significativa entre os três grupos (tabela 21).

**Tabela 21.** Espessura de epiderme, Azul de Alcian e Ferro coloidal nos grupos controle, ELA esporádica e ELA 8

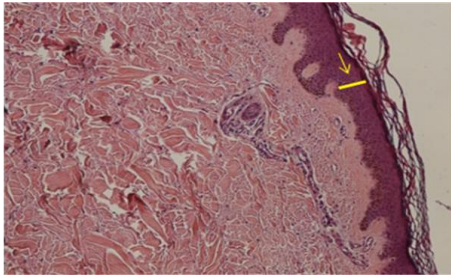
Técnicas histológicas	Controle n=5	ELA esporádica n=5	ELA 8 n=5	p (Anova)
(média)				
<b>Espessura epiderme (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	77,53 $\pm$ 15,78 $\mu\text{m}$	58,55 $\pm$ 8,12 $\mu\text{m}$	72,01 $\pm$ 16,56 $\mu\text{m}$	Ns
<b>Azul alcian</b>	171,5 $\pm$ 3,85/ $\text{mm}^2$	166,9 $\pm$ 4,19/ $\text{mm}^2$	162,3 $\pm$ 3,51/ $\text{mm}^2$	<0,0001 *
<b>Ferro coloidal</b>	152 $\pm$ 8,53/ $\text{mm}^2$	147,2 $\pm$ 11,66/ $\text{mm}^2$	133,70 $\pm$ 20,08/ $\text{mm}^2$	Ns

\* grupo controle versus ELA esporádica e ELA 8

**Tabela 22.** Razão da espessura de epiderme em relação à idade entre grupos controle, ELA esporádica e ELA 8

Espessura epiderme (µm)/idade em anos		Controle n=5	ELA esporádica n=5	ELA 8 n=5
Paciente 1		1,62	0,93	1,57
Paciente 2		2,42	0,87	1,68
Paciente 3		1,45	0,69	1,21
Paciente 4		2,09	1,30	1,48
Paciente 5		1,59	1,21	0,97
Total (média e desvio padrão)		1,83 + 0,4	1 + 0,25*	1,3 + 0,2

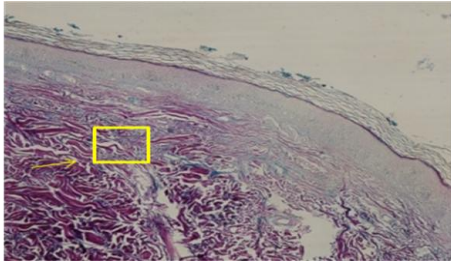
\* pacientes com ELA esporádica versus controles ( $p < 0,01$ , anova com pós-teste Bonferroni)



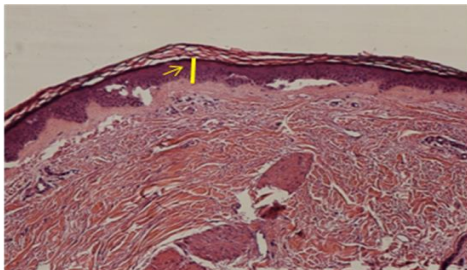
**Figura 5.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, coloração Hematoxilina-eosina. Aumento 40x. A seta indica local de medida da espessura da epiderme. Controle



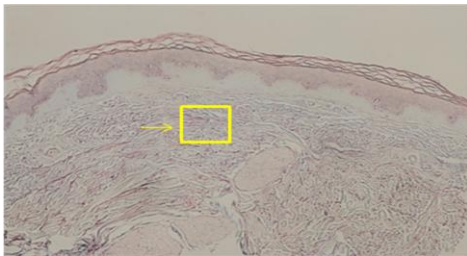
**Figura 6.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Azul de Alcian. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração. Controle



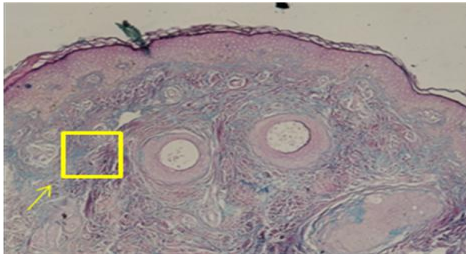
**Figura 7.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Ferro Coloidal. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração. Controle



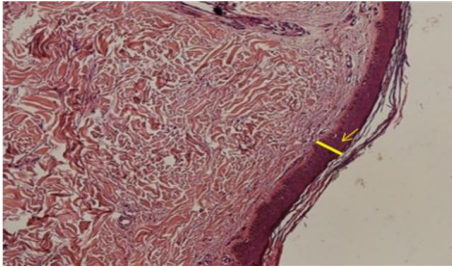
**Figura 8.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, coloração Hematoxilina-eosina. Aumento 40x. A seta indica local de medida da espessura da epiderme. ELA esporádica



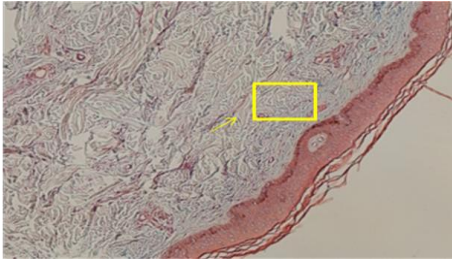
**Figura 9.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Azul de Alcian. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração. ELA esporádica



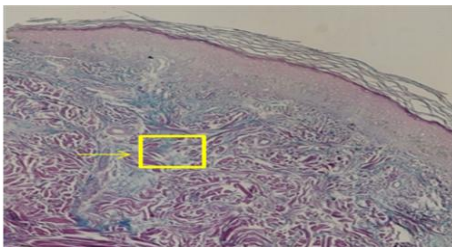
**Figura 10.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Ferro Coloidal. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração . ELA esporádica



**Figura 11.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, coloração Hematoxilina-eosina. Aumento 40x. A seta indica local de medida da espessura da epiderme. ELA 8



**Figura 12.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Azul de Alcian. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração. ELA 8



**Figura 13.** Cortes histológicos longitudinais de pele em parafina, Ferro Coloidal. Aumento 40x. A seta indica local de medida de intensidade de coloração. ELA 8

### 3. Técnica imunoistoquímica do nervo intraepidérmico - comparações entre 3 grupos

Em todos os pacientes submetidos à biópsia de pele foram visualizadas fibras intradérmicas, identificadas pela marcação com o PGP 9.5. Foram observadas fibras nas seguintes regiões: derme reticular, derme subpapilar e epiderme. A média de fibras nos 91 indivíduos selecionados nesse trabalho foi de  $3,69 \pm 2,1$ .

Não houve diferença significativa entre os grupos ELA 8 e ELA esporádica na avaliação de FNIE, entretanto, tanto a ELA esporádica como a ELA 8 tiveram média de FNIE significativamente menor que os controles (tabela 23). Não houve correlação entre espessura da epiderme e densidade de FNIE nos três grupos (teste de Pearson,  $p=ns$ ).

**Tabela 23.** Densidade de FNIE – comparação entre os grupos

	ELA esporádica n=14	ELA8 n=40	Controles n=37	P
FNIE	$3 \pm 1,35/\text{mm}$	$2,57 \pm 1,82/\text{mm}$	$5,16 \pm 1,72/\text{mm}^*$	$<0,0001$

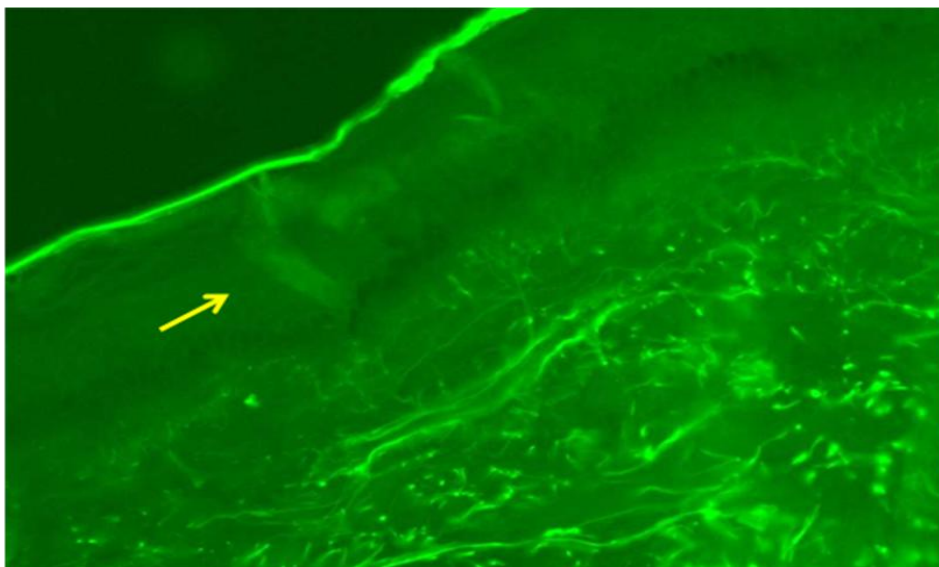
\* grupo controle significativamente maior que os dois grupos com ELA (Anova)

#### a) Variáveis demográficas/clínicas versus FNIE

##### Controles

Os dados de FNIE de indivíduos controle estão listados na tabela 31 do anexo.

Não houve correlação entre a quantidade de FNIE e a idade atual ( $p=ns$ , teste de correlação de Pearson). Também não houve diferença estatística na quantidade de fibras intraepidérmicas ao comparar diferentes gêneros ( $5,21 \pm 1,30$  em mulheres vs  $5,11 \pm 2,06$  em homens;  $p=ns$ , teste T não pareado) ou cores de pele ( $4,97 \pm 1,88$  em brancos;  $4,56 \pm 1,06$  em pardos e  $5,75 \pm 1,51$  em pretos;  $p=ns$ , ANOVA) (figura 14).



**Figura 14.** Cortes histológicos longitudinais de pele, em congelação. Fluorescência. Seta indicando nervo intraepidérmico em controles

### ELA esporádica

Os dados de FNIE de pacientes com ELA esporádica estão listados na tabela 32 do anexo. A amostra de pele foi coletada no momento do exame neurológico.

Houve moderada correlação inversa em relação à idade atual e número de fibras nervosas intraepidérmicas ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,47$ , teste de correlação de Pearson), mostrando que, nesta população, pacientes mais jovens apresentavam maior FNIE (figura 15).

Houve uma quase perfeita correlação entre tempo de utilização de BiPAP e densidade de FNIE, com os pacientes que usavam por mais tempo tendo uma menor quantidade de FNIE ( $p < 0,01$ ,  $r = 0,95$ , teste correlação Pearson). Pacientes em uso de BiPAP tinham significativamente menos FINE que os que não usavam ( $1,98 \pm 0,95$  vs  $3,56 \pm 1,23$ ,  $p < 0,05$ ; teste T não pareado).

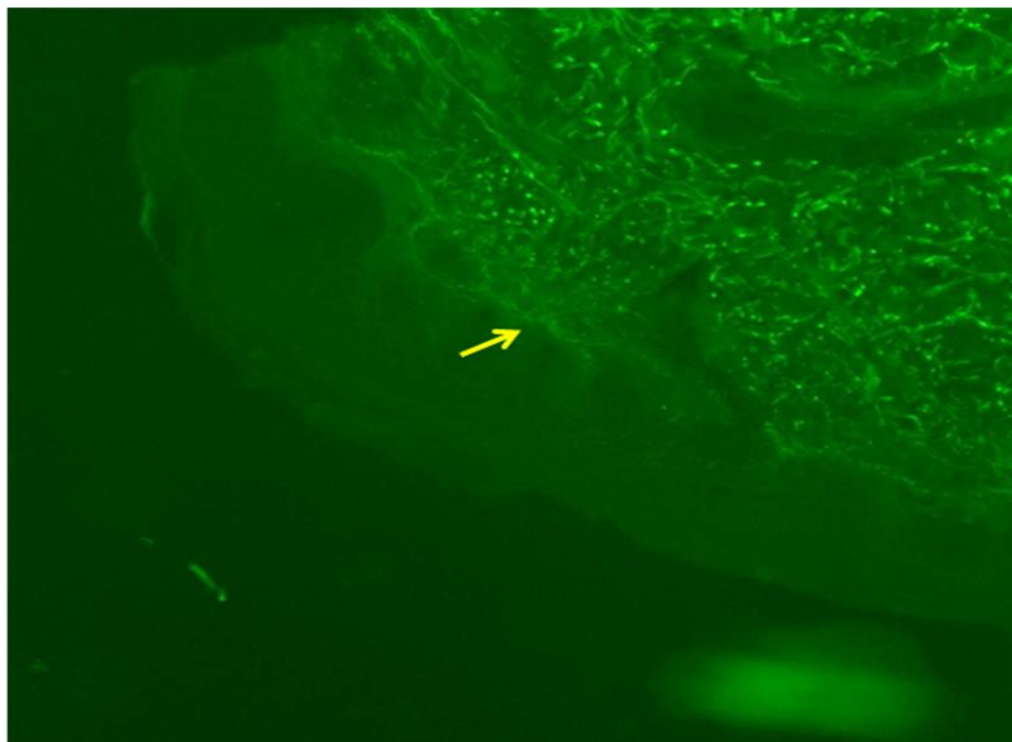
Não houve diferença significativa na densidade FNIE quando analisados os seguintes parâmetros: sexo ( $2,97 \pm 1,32$  em mulheres vs  $3,02 \pm 1,50$  em homens,  $p = ns$ ; teste T não pareado), cor ( $3,08 \pm 1,41$  em brancos;  $2,84 \pm 0,62$  em em pardos/pretos;  $p = ns$  teste T não pareado), tempo de fraqueza ( $p = ns$ , Spearman), tempo de câibra ( $p = ns$ , Spearman), El Escorial (mediana 3 em cinco pacientes classificados como provável com auxilio laboratorial/provável vs 3 [quartis: 1,45-3,95] em nove pacientes



classificados como definido;  $p=ns$ , teste T não pareado) ou marcha (mediana 3 [1,85-4,6] em oito pacientes classificados como marcha nível 1 ou 2, vs marcha nível 3 [quartis:1,15-3,95] em seis pacientes classificados como marcha 3;  $p=ns$ , teste T não pareado). Também não houve associação entre a densidade de FNIE e as seguintes variáveis (Tabela 24): câibras e queixa sensitiva ( $p=ns$ ; teste T não pareado). O cálculo não foi feito pra as seguintes variáveis, devido ao insuficiente número de pacientes por subgrupo: tabagismo, fraqueza, sinais piramidais, traqueostomia ou alterações objetivas nas sensibilidades superficial e profunda.

**Tabela 24** – Associação entre tabagismo, fraqueza, câibra, sinais piramidais, traqueostomia, queixa sensitiva e alterações nas sensibilidades e densidade de FNIE em pacientes com ELA esporádica

	Ausente	Presente	P
Tabagismo	2,71±1,26/mm n=10	3,72±1,50/mm n=4	-
Fraqueza	n=0	3±1,35 n=14	-
Câibra	3,31±1,45/mm n=8	2,58±1,21/mm n=6	ns (teste T não pareado)
Sinais piramidais	3 n=1	3,0±1,41 n=13	-
Traqueostomia	3,0±1,41/mm n=13	3/mm n=1	-
Queixa sensitiva	3,35±1,79/mm n=6	2,73±0,97/mm n=8	ns (teste T não pareado)
Alteração sensibilidade superficial	3,14±1,37/mm n=12	2,15±1,20/mm n=2	-
Alteração sensibilidade profunda	3,31±1,42/mm n=10	2,22±0,90/mm n=4	-



**Figura 15.** Cortes histológicos longitudinais de pele, em congelação, Fluorescência. Seta indicando nervo intraepidérmico em ELA esporádica

## ELA 8

Os dados de FNIE de pacientes com ELA 8 estão listados na tabela 33 do anexo. A amostra de pele foi coletada no momento do exame neurológico.

Com relação à idade atual, não houve correlação entre idade e densidade intraepidérmica ( $p=ns$ , Pearson).

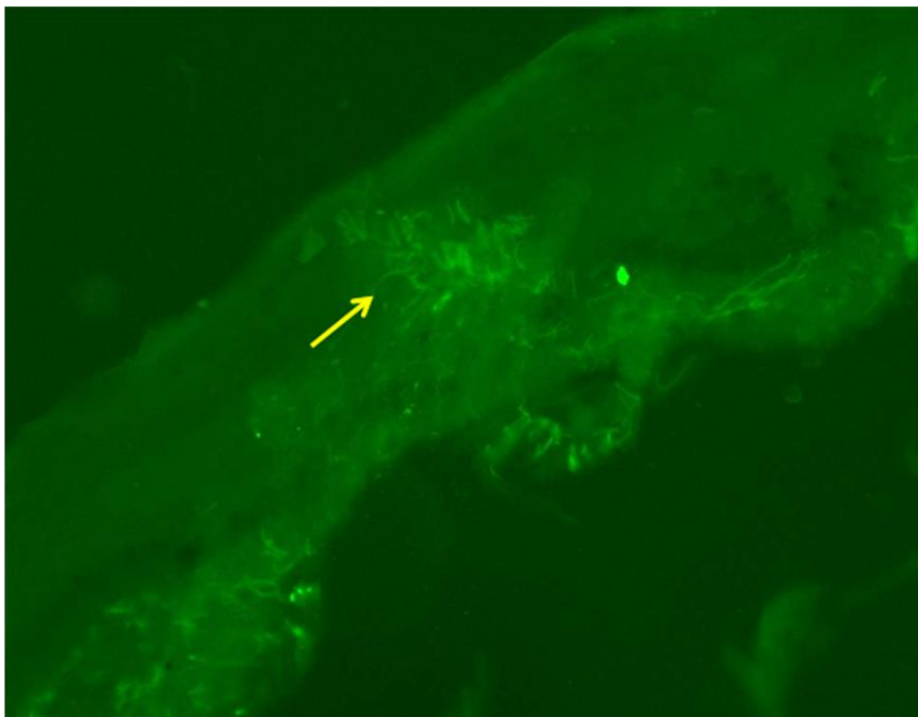
Houve diferença significativa na quantidade de FNIE ao comparar sexos, com mulheres apresentando menor densidade de fibras intraepidérmicas quando comparadas aos homens ( $1,93 \pm 1,37$  em mulheres vs  $3,2 \pm 2,01$  em homens,  $p < 0,05$ ; teste T não pareado).

Não houve diferença significativa quando analisados os seguintes parâmetros: cor ( $2,68 \pm 1,92$  em brancos;  $2,13 \pm 1,39$  em pardos;  $p=ns$  teste T não pareado), tempo de fraqueza ( $p=ns$ , Spearman), tempo de câibra ( $p=ns$ , Spearman), tempo de tremor ( $p=ns$ , Spearman), tempo de uso de BiPAP ( $p=ns$ , Spearman), El Escorial (mediana 3 [quartis:1,8-4,65], em sete pacientes classificados como possível, 1,65 [quartis:1-4,45], em 14 pacientes classificados como provável com auxílio laboratorial, 1,15 [quartis:1-2,8] em seis pacientes classificados como provável e 2 [quartis:1,7-4,1] em 13 pacientes classificados como definido,  $p=ns$ ; Kruskal-Wallis) ou marcha (mediana 2

[quartis:1,3-3,8] em 17 pacientes classificados como marcha nível 1, 4 [quartis:2,15-7,15] em sete pacientes classificados como marcha 2, 1,7 [quartis: 1-3,6] em 15 pacientes classificados como marcha 3;  $p=ns$ ; Kruskal-Wallis. Não foi incluído no cálculo um paciente classificado como marcha 4, com 0,3 FNIE.

Com relação à alteração de sensibilidade vibratória foi observada uma relação positiva entre esta alteração e a redução de FNIE ( $p<0,05$ ; teste T não pareado).

Não houve associação entre a densidade de FNIE e os seguintes dados (Tabela 25): tabagismo, tremor, sinais piramidais, uso de BiPAP, queixa sensitiva e alterações objetivas na sensibilidade superficial. ( $p=ns$ ; teste T não pareado). O cálculo não foi feito pra as seguintes variáveis, devido ao insuficiente número de pacientes por subgrupo: fraqueza, câibra e traqueostomia.



**Figura 16.** Cortes histológicos longitudinais de pele, em congelação, Fluorescência.

Seta indicando nervo intraepidérmico em ELA 8

**Tabela 25** – Associação entre tabagismo, fraqueza, câibra, tremor, sinais piramidais, traqueostomia, queixa sensitiva e alterações nas sensibilidades e densidade de FNIE em pacientes com ELA 8

		ausente	presente	P
Tabagismo		2,64 $\pm$ 1,96/mm n=30	2,36 $\pm$ 1,40/mm n=10	ns (teste T não pareado)
Fraqueza		3,22 $\pm$ 1,77/mm n=4	2,50 $\pm$ 1,84/mm n=36	-
Câibra		2,07 $\pm$ 1,29/mm n=4	2,62 $\pm$ 1,88/mm n=36	-
Tremor		2,64 $\pm$ 1,32/mm n=7	2,55 $\pm$ 1,93/mm n=33	ns (teste T não pareado)
Sinais piramidais		2,71 $\pm$ 2,11/mm n=22	2,39 $\pm$ 1,42/mm n=18	ns (teste T não pareado)
Traqueostomia		2,62 $\pm$ 1,83/mm n=38	1,65 $\pm$ 1,90/mm n=2	-
Uso BiPAP		2,70 $\pm$ 1,92/mm n=31	2,12 $\pm$ 1,42/mm n=9	ns (teste T não pareado)
Queixa sensitiva		2,98 $\pm$ 1,90/mm n=26	1,87 $\pm$ 1,43/mm n=14	ns (teste T não pareado)
Alteração superficial	sensibilidade	2,50 $\pm$ 1,48/mm n=32	2,82 $\pm$ 2,95/mm n=8	ns (teste T não pareado)
Alteração profunda	sensibilidade	2,96 $\pm$ 1,92/mm n=30	1,39 $\pm$ 0,69/mm n=10	p< 0,05 (teste T não pareado)

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1. Grupo controle – dados demográficos

Ao avaliar o grupo controle em relação à idade, esse grupo foi representativo da população na região Sudeste, conforme os dados do último censo divulgados pelo IBGE 2010, que revelam uma média de idade considerando todos os sexos de 33,6 anos (IBGE, 2010). Quanto ao sexo, o padrão de distribuição também é semelhante ao observado pelos dados do IBGE, com uma proporção de 93,4 homens para cada grupo de 100 mulheres em áreas urbanas. Quanto à distribuição de cor/raça, o grupo controle apresentava uma distribuição semelhante ao observado na população Brasileira (47,7% de brancos, 43,1% de pardos e 7,6% de pretos) e nos Estados da União que constituem a região Sudeste (IBGE, 2010).

### 6.2. ELA esporádica – dados demográficos e características clínicas

Quanto à idade no momento do diagnóstico, diversos autores descrevem o aparecimento dos primeiros sintomas na sexta década de vida da mesma forma que ocorreu na presente casuística (STRONG et al., 2003, ZOCCOLELLA et al., 2006, SILANI et al., 2011), com média de idade variando de 55-65 anos (SILANI et al., 2011). Menos de 10% da nossa amostra de ELA esporádica tinha menos de 40 anos, de forma semelhante a outros grupos, onde 13 a 15 % dos pacientes iniciaram os sintomas antes dos 40 anos de idade (STRONG et al., 2003, ZOCCOLELLA et al., 2006). Esses dados referem-se a estudos europeus e americanos. Dados epidemiológicos de estudos brasileiros realizados por DIETRICH-NETO et al., 2000, WERNECK et al., 2007 e CASTRO-COSTA et al., 2000, mostraram idade de início inferior ao observado nesta casuística, respectivamente 52, 54,4 e 42,2 anos, quando consideradas todas as formas de esclerose lateral amiotrófica, inclusive as formas familiares.

Na ELA esporádica a incidência e prevalência da doença são maiores no sexo masculino, especialmente em idades precoces, com distribuição igualitária entre os sexos com o aumento da idade (MCCOMBE et al., 2010). No entanto, autores como WERNECK et al., 2007 e SILANI et al., 2011, não encontraram diferenças entre sexos nas suas casuísticas. Em nosso grupo, a distribuição igualitária entre os sexos deve-se ao pareamento com a ELA 8, com exclusão de pacientes com envolvimento bulbar como sintoma inicial, sendo que esta forma de apresentação é mais frequente no sexo feminino (SILANI et al., 2011 e MCCOMBE et al., 2010).

Nos quatorze pacientes estudados, a fraqueza foi o sintoma inicial, o que é correspondente com casuísticas internacionais (SILANI et al., 2011 e MCCOMBE et al., 2010). WERNECK et al., 2007, em estudo de 251 casos brasileiros, também descreve a fraqueza como sintoma inicial em todos os pacientes que tiveram a forma espinhal como início da doença. Quanto ao tempo de doença, havia pacientes com tempo de doença prolongado, o que é justificado pelo pareamento da amostra, com exclusão de formas de início bulbar, associadas a pior sobrevida (KIERNAN et al., 2011).

O sintoma câibra esteve presente em 43% dos pacientes desta amostra, com surgimento deste sintoma após manifestação inicial de fraqueza. KIERNAN et al., 2011 e SILANI et al., 2011, encontraram em revisões de séries de pacientes a presença de câibra e fraqueza como sintoma comum, de aparecimento concomitante à fraqueza, sendo responsável por menos de 5% como queixa inicial.

O envolvimento respiratório como sintoma inicial é pouco frequente em séries de pacientes com ELA, sendo encontrado por SILANI et al., 2011, como responsável por menos de 1% dos casos. Nos quatorze pacientes estudados, não havia a queixa respiratória como sintoma inicial.

A frequência de achados no exame neurológico nesta casuística são semelhantes aos descritos na literatura, exceto pelos achados de sinais piramidais como Babinski e Hoffman observados em uma proporção maior de pacientes que os dados de literatura (MCCOMBE et al., 2010, SILANI et al., 2011 e KIERNAN et al., 2011).

O comprometimento de nervos cranianos, sobretudo o X, XI e XII, esteve presente em 57% dos nossos pacientes, com dados semelhantes aos da literatura quando observados todas as formas de apresentação clínica, se início bulbar ou espinhal, não sendo encontrados dados em pacientes referentes ao envolvimento de pares cranianos em pacientes com início espinhal apenas (WERNECK et al., 2007, CASTRO-COSTA et al., 2000 MCCOMBE et al., 2010).

Pela classificação do El Escorial, a maioria dos pacientes foi classificada como ELA definida e provável com auxílio laboratorial, semelhante a estudos populacionais realizados por ZACCOLELLA et al., 2006 e TRAYNOR et al., 2000, que no momento do diagnóstico a maioria dos pacientes se apresenta com estas formas, com possível explicação dada pela demora entre surgimento dos sintomas e avaliação por especialista, levando uma média de 14 meses entre eles.

Não havia correlação entre idade e tempos de fraqueza e câibra com a classificação no El Escorial. A categoria do El Escorial no momento do diagnóstico não é um preditor de prognóstico, já demonstrado em estudos populacionais de TRAYNOR et al., 2000, BEGHI et al., 2002 e ZACCOLELLA et al., 2006. Esses autores avaliaram a acurácia do diagnóstico de ELA ao utilizar os critérios de El Escorial para ensaios clínicos, demonstrando baixa sensibilidade do mesmo, especialmente nas fases iniciais da doença e naqueles pacientes com apresentação inicial de neurônio motor inferior. TRAYNOR et al., 2000, ao acompanhar a evolução de 388 pacientes, observou que dos 254 pacientes que faleceram durante o seguimento, 90% deles apresentavam categorias definido/provável no óbito. 10% continuavam como suspeitos apesar de evidência, pela necropsia, de comprometimento do neurônio motor superior.

### **6.3. ELA 8 – dados demográficos e características clínicas**

Nessa população estudada, havia predomínio de pacientes na sexta década, com distribuição igualitária entre os sexos, de maneira semelhante ao descrito por NISHIMURA et al., 2004. Havia predomínio de brancos, apesar de dados do IBGE 2010 mostrarem predomínio de pardos nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, de onde vinham 30 pacientes desta amostra (os demais eram provenientes de São Paulo, onde, segundo IBGE 2010, 63,9% da população é branca). A predominância de brancos na nossa amostra é explicada pela concentração de famílias em cidades



pequenas no interior de Minas Gerais e Rio de Janeiro que possuem a mesma ancestralidade. NISHIMURA, et al. em 2005, ao realizar estudo de análise de haplótipos em famílias com diagnóstico de ELA 8, mostrou um efeito fundador comum para todas as famílias estudadas, onde foram avaliados 1500 indivíduos, de oito famílias distintas, com cerca de 200 pessoas com mutação P56S no gene da VAPB, revelando evento fundador há 23 gerações, coincidente com o período de colonização portuguesa no Brasil.

Não havia predominância entre os sexos, semelhante ao observado por NISHIMURA et al., 2004. Para todas as formas familiares de ELA são descritas proporções distintas de sexo, com estudos mostrando predominância de sexo masculino (MILLECAMPS et al., 2010;) enquanto outros com distribuição igualitária entre os mesmos (SILLANI et al., 2011;DAOUD et al., 20011).

Nos quarenta pacientes desse grupo, a idade de início variou segundo sintoma considerado, sendo o sintoma tremor o de início mais precoce, com média de idade de 40,27 anos, seguido por câibra, com média de idade de 44,28 anos e fraqueza com média de 46,28 anos. Nenhum paciente apresentava início de sintoma descrito como fasciculação ou envolvimento respiratório.

Nessa população em estudo, os sinais de neurônio motor inferior predominaram, com os seguintes achados em ordem de frequência: fraqueza, tremor, atrofia, hiporreflexia, fasciculações, hipotonia, hiporreflexia, alteração de nervos cranianos, alteração sensitiva profunda e superficial, outros sinais piramidais e hipertonia. A fraqueza apresentou um padrão de envolvimento mais proximal nos quatro membros. Os nervos cranianos envolvidos foram X, XI e XII, cuja alteração esteve presente em 40% dos pacientes, não sendo em nenhum deles a manifestação inicial. Estes dados são semelhantes aos observados por NISHUMURA et al., 2004 e FUNKE et al., 2010.

NISHIMURA, em 2004, na caracterização inicial desta forma familiar, descreve 11 indivíduos com sintomas e sinais clínicos de ELA, onde a média de idade no início dos sintomas foi de 38 anos, com todos os pacientes apresentando sinais de envolvimento do neurônio motor inferior, e um com sinais também de neurônio motor superior. Cinco pacientes apresentavam envolvimento bulbar, com tremor postural sendo observado precocemente em 8 pacientes, permanecendo estável durante a progressão da

doença. Havia câibra como sintoma importante, descrita como incapacitante. Dos 11 pacientes, apenas um tinha a fraqueza como manifestação inicial, sendo quatro com sintoma inicial de fasciculação, dois com tremor e um paciente com câibra e tremor como manifestação inicial. Não havia evidência de antecipação, e a idade de início foi mais jovem que outras formas de ELA familiar ou ELA esporádica. Havia uma progressão mais lenta da doença e frequência elevada de sintomas atípicos como tremor postural e câibra incapacitante. Nesse estudo não havia a informação sobre tempo de doença.

Posteriormente, essa autora descreveu 24 pacientes de sete famílias distintas, com idade variando de 25 a 55 anos, com distribuição igualitária entre os sexos. Câibra, fasciculação, fraqueza e hiporreflexia ou arreflexia foram descritos em todos os pacientes. Observou ainda três fenótipos distintos: amiotrofia espinhal de início tardio, ELA típica e ELA atípica. Oito pacientes, com média de idade de início dos sintomas de 46 anos e 54 anos no momento da avaliação, foram classificados como amiotrofia espinhal, onde não havia sintomas bulbares ou piramidais. O grupo classificado como ELA atípica era composto por 15 pacientes, com média de idade de 38 anos quando dos primeiros sintomas e 50 anos no momento da avaliação. Nestes, além dos sinais de envolvimento do neurônio motor inferior, havia ainda comprometimento bulbar e de neurônio motor superior, sendo chamados de atípicos pois todos apresentavam tremor postural. Cinco pacientes apresentaram evolução típica de ELA, com combinação de sinais e sintomas de ambos neurônios motores superior e inferior, com sobrevida inferior a 5 anos. A autora chama a atenção que estes cinco pacientes eram de 4 famílias distintas e que nestas haviam outros pacientes com evolução atípica por apresentarem tremor, mostrando que a mesma mutação é responsável por diferentes fenótipos nestas famílias.

FUNKE em 2010, descreveu o primeiro paciente sem ancestralidade portuguesa ou brasileira, residente no norte da Alemanha, com história familiar de doença neuromuscular em três gerações precedentes, com 43 anos de idade, com fraqueza há dois anos, de caráter proximal de quatro membros, presença de fasciculação, reflexos tendinosos normais e arreflexia de aquileus, sem sinais piramidais, não sendo observado o mesmo efeito fundador das famílias descritas no Brasil. Não havia no relato, a presença de tremor nem câibra. Ainda em 2010, MILLECAMP et al.,

descreveu numa série de 162 famílias francesas com ELA familiar, uma família japonesa, com paciente apresentando fraqueza em membros inferiores, de início na sexta década, com sinais de neurônio motor inferior e doença de longa duração, não havendo referência sobre tremor ou câibra.

A apresentação temporal dos sintomas nesta amostra parece particular neste grupo, pois o tremor precedeu a fraqueza em seis anos e a câibra precedeu a fraqueza em dois anos. Quando comparados os sinais clínicos às outras formas familiares de ELA, a predominância de sinais do neurônio motor inferior são comuns da grande maioria, embora o fenótipo dependa da mutação encontrada, com significativa variabilidade clínica intra e inter familiar (SIDDIQUE e AJROUD-DRISS, 2011). MILLECAMPS et al. em 2010, ao estudar aspectos clínicos e genéticos de 81 pacientes com formas familiares da doença, os sintomas iniciais apresentados variavam de acordo com a mutação envolvida, com predominância de fraqueza e sinais de neurônio motor inferior para todas as mutações estudadas ( SOD1, TARDBP, FUS, VAPB).

SIDDIQUE e AJROUD-DRISS, 2011 chamam a atenção para mutações na SOD1 serem associadas a rápida progressão da doença, enquanto outras estarem associadas a curso lento, com evolução maior que 10 anos. Na maioria das formas familiares descritas, há uma predominância de sintomas de neurônio motor inferior, com leve a moderado envolvimento do trato cortico-espinhal. Nas mutações no gene da TDP43, o fenótipo clássico da ELA esporádica predomina, com início de sintomas de fraqueza e atrofia, com envolvimento dos neurônios motores superiores e também dos inferiores (DAOUD et al.,2011).

Nesta amostra, o tremor foi observado em 82,5% dos pacientes, precedendo sintomas de câibra e fraqueza, com alguns pacientes referindo início ainda na adolescência. O tremor foi classificado como postural, manifestando-se em membros superiores, sem envolvimento de segmento cefálico ou voz.

Nestes pacientes não foi possível classificar como tremor essencial, que é uma condição clínica comum, sendo o distúrbio de movimento mais frequente (MERNER et al., 2012), com aumento de incidência com envelhecimento, especialmente acima de 65 anos de idade. O tremor é classificado como esporádico, familiar ou senil. Nos casos familiares, 50-70% apresentam padrão de herança dominante, com

aparecimento mais precoce que nas formas esporádicas. Até o momento foram descritos três loci distintos (3q13, 2p25-p22,6p23. JAINSKA-MYGA E WIDER ,2012), sem gene identificado até o presente momento.

A associação de tremor e ELA é relatada por MERNER et al., 2012 ,onde descreveu uma família com tremor essencial e mutação no gene FUS, com mutação distinta às descritas como associadas ao fenótipo ELA. Na ELA 4, por mutação do gene da senataxina, são descritos pacientes com tremor associado a ataxia (HIRANO et al., 2011). As descrições de tremor nas formas esporádicas são descritos por relatos de casos ou como sinais atípicos da doença, associados a outros sinais extrapiramidais. KATO, et al., 1995, descreveu paciente com 51 anos com sinais clínicos de envolvimento dos neurônios motores inferior e superior, além de retinite pigmentosa, palato ogival e tremor, com envolvimento bulbar ao longo da doença. A necrópsia mostrou atrofia de globo pálido, além de mesencéfalo, córtex motor e corno anterior de medula. Este caso é semelhante a seis outros descritos até o presente momento na literatura. No Brasil, WERNECK et al. 2007, ao estudar forma de apresentação clínica em 251 pacientes com diagnóstico de Esclerose lateral amiotrófica, observou 13 pacientes com tremor, sem descrição de localização ou se foram observados em formas familiares da doença. O tremor descrito nos pacientes com ELA 8 é uma característica peculiar desta população.

Nos que apresentaram sintomas bulbares, a atrofia de língua e fasciculações predominavam, não sendo observados sintomas pseudo-bulbares nestes pacientes.

Dos quarenta pacientes avaliados, haviam dois pacientes com alterações psiquiátricas, um com depressão e outro com sintomas psicóticos, em ambos sendo afastadas lesões estruturais de sistema nervoso central pela realização de ressonância magnética de crânio.

Quanto à classificação pelo El Escorial, não levando em consideração o teste genético, havia uma tendência a menor frequência de formas definidas quando comparado com o grupo da ELA esporádica, com a maioria classificada como possível com suporte pela ENMG, explicado pela predominância de sintomas de neurônio motor inferior neste grupo, sendo a hiporreflexia, atrofia muscular e fasciculações mais frequentes que sintomas do primeiro neurônio motor, havendo hiperreflexia em apenas

40 % dos pacientes, hipertonia em 2,5% e outros sinais piramidais como Babinski em 7,5% dos pacientes. Pelos critérios de El Escorial quando há uma mutação patogênica definida, o diagnóstico pode ser dado como ELA clinicamente definida com auxílio laboratorial (BROOKS et al., 2000). Nos casos sem definição de mutação, mantém-se os critérios da ELA esporádica. A classificação destes pacientes pelo El Escorial sem levar em consideração a mutação na VAPB, é justificada para melhor comparação clínica entre os grupos ELA.

Houve moderada correlação inversa entre El Escorial e idade de início de fraqueza e câibra, havendo correlação com os tempos de fraqueza e câibras. Isto reforça a idéia de que a frequência de sinais neurológicos nas quatro regiões aumenta durante o curso da doença, bem como reforça a importância da câibra precoce no diagnóstico desta forma familiar. Segundo TRAYNOR et al., 2000, os paciente classificados como suspeitos, com envolvimento único do neurônio motor inferior, apresentam o mesmo curso clínico de outras categorias. Não houve correlação entre idade e tempo de tremor com o El Escorial. Não há na literatura correlação entre tremor, mesmo nos pacientes com ELA 8 descritos previamente, e El Escorial, talvez por tratar-se de sintoma associado que não interfere na gravidade clínica no início da doença.

#### **6.4. Dados demográficos- comparações entre os 3 grupos :**

Não havia diferença entre os sexos quando comparados os grupos. A ausência de predominância do sexo masculino na ELA esporádica, também descrita por vários autores (CHIO et al.,2005, MCCOMBE et al.,2010, KIERNAN, et al.,2011) deve-se ao pareamento artificial desta amostra.

O grupo controle era mais jovem que os dois grupos de ELA.

Não havia diferença quanto à cor quando comparados os grupos de ELA esporádica e ELA 8. Havia mais brancos que soma de negros e mulatos no grupo ELA 8 quando comparado a controles, explicado pela origem européia desta mutação ( NISHIMURA et al., 2005) e a residência em pequenas cidades de Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Quanto ao tabagismo, não havia diferença nas formas de ELA e não havia dados colhidos nos controles. O tabagismo foi incluído nesta pesquisa por ser associado a aumento de risco para desenvolvimento de ELA (ARMON, 2009).

### **6.5. Dados clínicos – comparação entre os grupos ELA**

A ELA 8 quando comparada à ELA esporádica, apresentou características singulares, constituindo a forma de apresentação e evolução clínica uma forma particular de esclerose lateral familiar só observada nesta população brasileira.

O grupo ELA 8 foi constituído de pacientes mais jovens, o que se assemelha a dados comparativos a descrições de NISHIMURA et al.,2004 e FUNKE et al., 2010. As formas familiares de esclerose lateral amiotrófica acometem indivíduos mais jovens independentemente da mutação encontrada (MILLECAMPS et al.2010, SILLANI et al., 2011,TICOZZI et al., 2011).

Os pacientes com ELA 8 apresentavam sintomas, se considerada a fraqueza, numa idade significativamente inferior, com tempo de doença mais prolongado comparado ao grupo ELA esporádica. Por outro lado a frequência de atrofia é significativamente menor que no grupo com ELA com esporádica sugerindo uma doença de evolução mais lenta. A câibra foi um sintoma frequente, precedendo os achados motores, de forma semelhante ao descrito previamente por NISHIMURA et al.,2004, se constituindo num sintoma incapacitante. Segundo ZACCOLELLA, et al.,2006, em estudo populacional de pacientes italianos avaliados segundo critérios de El Escorial e Airlie House, os sintomas de câibra ou fasciculação isolados como apresentação inicial, são considerados de exclusão dado a baixa especificidade desses achados como sintoma de esclerose lateral amiotrófica. No grupo ELA esporádica a câibra procedeu a fraqueza ou foi de aparecimento concomitante, demonstrando que na população particular de ELA 8, o sintoma câibra, mesmo que isolado, deva ser considerado como sintoma inicial desta doença.

O tremor é achado isolado desta população com ELA 8, não sendo encontrado até o momento, sinal semelhante em outras formas de esclerose lateral familiar. Havia

quatro pacientes com manifestação de tremor sem fraqueza, em dois deles o sintoma câibra foi descrito como incapacitante. Este dado não é descrito em outras formas familiares de esclerose lateral amiotrófica.

Apesar da fraqueza surgir mais precocemente na ELA 8, não houve diferença significativa em relação ao número de pacientes com fraqueza nos 2 grupos, que se deve ao curso natural de evolução da doença, na qual a fraqueza é progressiva, sendo um sinal de envolvimento de ambos neurônios motores (TRAYNOR et al., 2000). Houve diferença no padrão de distribuição da força muscular em membros superiores, com predomínio proximal na ELA 8, já descrito previamente por NISHIMURA et al., 2004, MILLECAMP et al., 2010 e TICOZZI et al., 2011. Esses autores descrevem um padrão de distribuição de fraqueza proximal especialmente em membros inferiores nos pacientes com ELA 8, mas no nosso grupo essas diferenças estatisticamente significantes não foram observadas pois os pacientes foram avaliados no curso de sua evolução clínica com alguns pacientes com tempo prolongado de doença, nos quais parece haver perda deste padrão de distribuição, semelhante ao que ocorre na ELA esporádica, onde o padrão em geral é de fraqueza distal, com o evoluir da doença, a fraqueza também é proximal (STRONG et al., 2003, ZOCCOLELLA et al., 2006 e SILANI et al., 2011).

Os pacientes com ELA esporádica apresentavam sinais de envolvimento do neurônio motor superior numa frequência estatisticamente maior quando comparados a ELA 8, o que demonstra que nesta forma de doença os sintomas predominantes são de neurônio motor inferior. Aparentemente, os pacientes com ELA 8 que apresentavam sintomas clássicos de ELA, evoluíram com mais fraqueza que aqueles com sintomas puros de neurônio motor inferior.

Não houve diferença significativa quanto à presença de queixas bulbares. Nesta amostra, foram excluídos pacientes com forma primariamente bulbar na ELA esporádica, o que pode explicar essa ausência de diferença, pois nenhum dos 48 pacientes com ELA 8 inicialmente avaliados, apresentavam sintomas bulbares como os iniciais. TICOZZI et al., 2011, em uma revisão dos aspectos clínicos e genéticos das formas familiares, descreve frequência de envolvimento bulbar variável de acordo com o subtipo da ELA. Exceto pela ELA 5, na qual os sintomas bulbares podem ser

concomitantes aos sintomas motores, nas outras formas de ELA (2,6,9,10,11) os sintomas bulbares aparecem no curso da doença. Este autor descreve ainda, ausência de envolvimento bulbar apenas na ELA 4.

Não havia diferença quanto ao uso de ventilação mecânica não invasiva (VMNI) (BiPAP) e traqueostomia, embora o emprego de ventilação na ELA8 ocorra com indivíduos mais jovens, mas com maior tempo de doença quando comparados a ELA esporádica, o que sugere que esta forma familiar tenha um curso menos agressivo quando comparada às formas clássicas da doença. A média de tempo para o emprego de VMNI e traqueostomia nos pacientes com ELA é variável, sendo mais precoce naqueles com forma bulbar como manifestação inicial, e mais tardio naqueles com apresentação espinal e início mais jovem, tendo como média para todas as formas em torno de 35 meses para o emprego de traqueostomia (SPATARO, et al., 2012).

Não havia diferença quanto ao grau de independência ao avaliar os grupos, sendo que aparentemente, os pacientes com ELA 8 apresentam forma menos grave de doença por ter mais tempo de doença com mesma escala funcional de deambulação e mesma classificação pelo El Escorial. Além disso, os pacientes com ELA 8 não apresentam em sua forma de apresentação, características clínicas associadas a pior prognóstico que são: idade de início de sintomas tardio, envolvimento respiratório precoce e início bulbar. Os aspectos relacionados a melhor prognóstico são: forma espinal, diagnóstico mais tardio e idade menor no início da apresentação, além daquelas formas de envolvimento puro do neurônio motor inferior (MILLECAMPS et al., 2010 e KIERNAN et al., 2011).

## **6.6. Análise intragrupo ELA 8**

Não foram observadas diferenças entre os sexos quando avaliados os parâmetros clínicos, El Escorial e exame neurológico, não sendo encontrados dados na literatura com diferenças entre os sexos tanto na ELA 8 quanto nas outras formas familiares pesquisadas (NISHIMURA et al., 2005, MILLECAMPS 2010, SIDDIQUE, et al., 2011, DAOUD et al., 2011).

## **6.7. Avaliação sensitiva**

### **a) Quadro clínico**



## **ELA esporádica**

Nos 14 pacientes estudados, 57% tinham queixas sensitivas, sendo observado, ao exame neurológico, maior proporção de alterações objetivas da sensibilidade profunda (28%) que alterações da sensibilidade superficial (14,3%), o que está de acordo com descrito previamente nas formas esporádicas da doença, com alteração de sensibilidades variando entre diversos autores. Estudo de MONDELLI et al., 2004, descreveu uma prevalência de 20 % de alteração sensitiva ao exame neurológico, verificando nestes pacientes redução da velocidade de condução sensitiva pela ENMG em 7 a 22% e alteração de potencial evocado sensitivo em 33 a 69% dos casos com achados sensitivos ao exame neurológico. HAMMAD et al., 2007, ao avaliarem 103 pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica, encontraram frequência de 22% de queixas sensitivas, com alterações objetivas na sensibilidade observadas em 20% dos pacientes, especialmente redução da sensibilidade vibratória. Este mesmo autor submeteu estes pacientes a biópsia de nervo sural, demonstrando redução de fibras mielinizadas de grande calibre em 91% destas biópsias. Mais recentemente, WEISS et al., 2011, descreveram uma proporção de 25% de pacientes com queixa sensitiva, com frequência semelhante de alterações nas sensibilidades superficial e profunda. Os padrões de alterações encontrados por estes autores são especialmente redução de sensibilidade vibratória de membros inferiores e padrão de hipoestesia em bota e luva, que ocorriam independente da idade avaliada. Os estudos com necrópsia revelam alterações de nervos sensitivos em ambas as formas familiar e esporádica de ELA, embora menos evidentes que as alterações dos neurônios motores (ENGEL et al., 1959; HIRANO et al., 1967; HEADS et al., 1991).

Segundo os critérios de EL Escorial revisados, a presença de alterações sensitivas exclui o diagnóstico de ELA. Nos quatorze pacientes estudados, apesar de alterações objetivas no exame das sensibilidades, não havia alteração em velocidades de condução sensitiva pela ENMG.

## **ELA 8**

Nos 40 pacientes estudados, as queixas sensitivas foram observadas em quatorze deles, sendo encontrado, no exame neurológico, maior proporção de alteração da sensibilidade profunda, semelhante ao observado por CHEN et al., 2004 e HAMMAD et

al., 2007 em outras formas familiares de doença, especialmente em mutações na SOD1. Nesse grupo, as velocidades de condução sensitiva pela ENMG foram normais.

### **Comparação entre os grupos ELA**

Não havia diferença quanto à queixa sensitiva, nos grupos ELA esporádica e ELA8. Nos pacientes com queixa sensitiva de ambos os grupos, os pacientes com ELA 8 eram mais jovens quando iniciaram seus sintomas de fraqueza e câibra, não apresentando diferença quanto ao tempo de fraqueza.

Em ambas as formas de ELA, os achados objetivos de alterações sensitivas foram em torno de 22%, sendo mais comuns as alterações da sensibilidade profunda. A alteração objetiva na sensibilidade e elevada frequência de queixas sensitivas já foram descritos previamente por HAMMAD et al., 2007 ,WEIS et al., 2011 e LUIGETTI et al., 2012. HAMMAD et al, 2007, ao estudarem clinicamente e por biópsia de nervo sural pacientes com ELA, encontram uma prevalência de 20% de alterações objetivas da sensibilidade em fases precoces da doença, em pacientes sem imobilidade ou caquexia, sugerindo que o processo fisiopatológico de lesão não esteja restrito aos neurônios motores, mas envolvendo neurônios sensitivos e suas projeções axonais. O fato do subgrupo de pacientes com ELA 8 e queixa sensitiva serem mais jovens que o subgrupo de pacientes com ELA esporádica e queixa sensitiva, não havendo diferença no tempo de doença entre os grupos, pode sugerir que as alterações sensitivas na ELA 8 possam ser característica desta forma de doença, enquanto na ELA esporádica possa estar associada ao envelhecimento. Essa possibilidade é corroborada por três fatos: a) a idade se correlaciona inversamente com a densidade de FNIE no grupo da ELA esporádica e não na ELA 8, b) a alteração de sensibilidade profunda não se correlaciona com a densidade de FNIE na ELA esporádica mas se correlaciona na ELA 8 e c) não houve correlação entre tempo de doença e densidade de FNIE na ELA 8 e ELA esporádica.

#### **b) Exame da pele**

Das 15 amostras de pele analisadas, não foram encontradas alterações de coloração ou elasticidade da pele nem úlceras de decúbito ou escaras. ONO et al., 1988, ao avaliarem a pele de pacientes com esclerose lateral amiotrófica,observaram

perda de elasticidade, com fenômeno de lento retorno após ser esticada, sendo observado geralmente após o segundo ano de doença, explicado pela redução do diâmetro das fibras de colágeno e desorganização das mesmas. O mesmo autor, em 1994 e 2000 descreve ausência de escaras nesta população, independente do tempo de doença ou estágios finais da doença ou caquexia, não encontrando uma explicação para este achado.

Não foram observadas diferenças na espessura da epiderme nestes três grupos, havendo uma tendência em observar uma epiderme mais retificada em indivíduos com ELA esporádica, com média de espessura da epiderme normalizados para a idade menor que controles, o que pode ser justificado pelo envelhecimento normal da pele, onde os indivíduos mais jovens apresentam mais papilas, saliências e reentrâncias que indivíduos acima de 65 anos (ORIÁ et al., 2003).

Não foram observados acúmulo de glicosaminoglicanos nas peles avaliadas, pois não foram observados alterações de coloração do azul de alcian e ferro coloidal. Havia menos marcação pelo azul de alcian nos pacientes com ELA 8 e ELA esporádica quando comparados a controles, sendo dado sem relevância pois nos controles não havia marcação forte pelo azul de alcian, que é o descrito como patogênico por ONO et al., 1988, 1994 e ONO em 2000.

A principal função do colágeno na pele é promover força mecânica e rigidez através de ligações covalentes entre as moléculas. Nos pacientes com ELA, ocorre uma marcante redução no diâmetro das fibrilas de colágeno no decorrer da doença (ONO et al., 1986), o que contrasta com o aumento progressivo observado durante o envelhecimento de indivíduos saudáveis (FORREST et al., 1972). Além disso, foi verificado aumento na quantidade de material amorfo entre as bandas e as fibrilas de colágeno (ONO et al., 1986 e 2000), o que provavelmente causa separação das fibrilas de colágeno. Este autor afirma que este é um achado observado em pele de pacientes com esclerose lateral amiotrófica, não sendo encontradas em outras formas de doença do neurônio motor como atrofia muscular espinhal. A dosagem de aminoácidos componentes do colágeno revelou uma significativa redução de hidroxiprolina, hidroxilisina e glicina no trabalho de ONO et al., 1990, o que indica um aumento da degradação do colágeno em relação à sua produção e é compatível com o aumento da

liberação de collagenase por fibroblastos de pacientes com ELA (BEACH et al., 1986). A solubilidade do colágeno na ELA se mostra aumentada em relação à das fibras normais, o que reflete um aumento do colágeno imaturo em detrimento do colágeno maduro insolúvel (ONO et al., 1992). Por fim, a densidade óptica do colágeno IV, principal componente da membrana basal, revelou-se bastante diminuída em relação aos controles normais, sendo verificada uma correlação negativa da densidade com o tempo de doença (ONO et al., 1998).

Além disso foi observado um aumento progressivo da quantidade de ácido hialurônico na pele de pacientes com ELA, sendo esse o responsável pela separação das bandas de fibrilas de colágeno (ONO et al., 1994). A excreção renal de ácido hialurônico também mostrou-se significativamente maior nesses pacientes, sendo diretamente proporcional ao tempo de doença (ONO et al., 1996).

Foi detectada a presença de placas de proteína  $\beta$  amilóide na parede de vasos cutâneos de pacientes com ELA (JOACHIM et al., 1989). Ainda permanece controverso se essas placas diferem daquelas presentes na doença de Alzheimer.

Recentemente tem sido descritas outras alterações na pele de pacientes com esclerose lateral amiotrófica; RODRIGUEZ et al., 2011 avaliaram 112 mitocôndrias de pele de 5 pacientes com esclerose lateral amiotrófica, comparando a controles, e observaram alterações morfológicas das mesmas, com organelas de menor calibre e com quebra da membrana externa, com perda de sua integridade, semelhante aos achados observados em mitocôndrias do sistema nervoso central. SUZUKI et al., 2010, encontraram presença da proteína TDP43 na pele de pacientes com ELA de maneira semelhante ao observado no sistema nervoso central, sugerindo que não só o neurônio motor seja envolvido nesta doença. Esses autores no entanto não identificaram um possível efeito na estrutura da pele de pacientes com ELA e acúmulo de TDP43.

Todos os achados previamente descritos especialmente por ONO e colaboradores, não foram reproduzidos nesta amostra, não sendo realizada a avaliação de fibras de colágeno.

### **c) Técnica imunoistoquímica do nervo intraepidérmico - comparações entre três grupos**

Em todos os pacientes submetidos à biópsia de pele foram observadas fibras intraepidérmicas, sendo que estas fibras são terminais de nervos sensitivos e autonômicos, como já havia sido demonstrado na literatura (MOURA et al., 2004 SOMMER, 2008 e WEIS et al., 2011).

Nos controles, os padrões de distribuição das FNIE foram semelhantes aos descritos previamente por McCARTHY et al., 1995. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na FNIE entre diferentes subtipos de cor/raça e sexo no grupo controle, como já descrito por outros autores como McCARTHY, 1995 e LAURIA, 1999. Também não foram encontradas diferenças na densidade de FNIE correlacionadas com a idade no grupo controle, apesar da redução da densidade de FNIE descrita com o aumento de idade, especialmente em indivíduos acima de 60 anos (McCARTHY, 1995 e LAURIA, 1999 e 2010). Entretanto, McARTHUR et al., 1998, relatam o pico de FNIE em indivíduos na segunda década de vida, com uma queda na terceira década que se mantinha estável nas faixas etárias seguintes, o que está em concordância com nossos achados. Além disso, no grupo controle não havia indivíduos na sétima década de vida.

No subgrupo ELA esporádica, os padrões de distribuição das fibras nervosas intraepidérmicas foram similares aos controles, havendo moderada correlação inversa entre a idade atual e o número de fibras, com pacientes mais jovens com maior densidade de FNIE. Na literatura, diversos autores correlacionam idade com densidade de fibras, com redução do número de FNIE especialmente em indivíduos acima de 60 anos (McCARTHY, 1998 e LAURIA, 1999 e 2010), sendo observado um decréscimo de 0,6 a 1,8 fibras/mm a cada década em indivíduos saudáveis (GORANSSON et al., 2004 e UMAPATHI et al., 2006). Não houve diferença entre sexos ou cor/raça como descrito por McCARTHY, 1998 e LAURIA, 1999.

Foi encontrada uma quase perfeita correlação entre o tempo de uso de VMNI (BiPAP) e densidade de FNIE, com pacientes com maior tempo de uso com menor densidade de FNIE. A presença de neuropatia tem sido descrita em pacientes com hipóxia e uso de ventilação invasiva. OZGE et al., 2001, ao avaliar queixa sensitiva, redução de sensibilidade vibratória e ENMG de 47 pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica com e sem hipoxemia e comparados a controles, encontrou uma

frequência elevada de neuropatias especialmente axonais, sendo maior em pacientes com hipoxemia que naqueles sem hipoxemia e com maior gravidade variando com o grau de hipoxemia, sugerindo um mecanismo de hipóxia com lesão do nervo periférico. O emprego de ventilação invasiva aumenta o risco de neuropatias, especialmente as polineuropatias, mais evidente nos indivíduos admitidos em unidades de terapia intensiva, em risco de sepse e alteração do estado nutricional com hipoalbuminemia (BIRD, RICH, 2002). EL-SALEM et al. 2012, avaliou mudanças eletrofisiológicas em nove pacientes sem doenças neurológicas submetidos a ventilação mecânica sem sepse, com ENMG realizada até 48 horas após início da ventilação e nos primeiros três dias de admissão hospitalar, observando que após sete a dez dias de ventilação mecânica, 56% dos pacientes apresentavam mudança no padrão da ENMG, com presença de neuropatias dos nervos mediano, ulnar e sural, com redução de velocidade de condução sensitiva, de forma semelhante ao descrito em pacientes com ventilação e sepse. Esse autor sugere que o mecanismo de agressão ao nervo esteja associado ao emprego de ventilação mecânica. Não foram encontradas referências quanto ao uso de VMNI (BiPAP) e neuropatia, mas sabe-se que o uso da VMNI (BiPAP) está indicado nas reduções de capacidade vital e hipoxemia, o que pode justificar este achado no grupo de pacientes com ELA esporádica. Outra possível justificativa para este achado é que todos os cinco pacientes em uso de BiPAP tinham mais que 60 anos, idade nos quais pode haver redução de densidade de FNIE.

Não houve correlação entre tempo de doença, forma de classificação pelos critérios El Escorial ou marcha com a densidade de FNIE, em ambos os grupos de ELA, apesar de ser descrito a redução na densidade de fibras com a progressão de doença nos pacientes com neuropatias diabética, neuropatia associada ao HIV, neuropatia imunomediadas e hereditárias (LAURIA et al., 2009 e 2010 ).

O único estudo que avaliou densidade de FNIE por biópsia de pele em pacientes com esclerose lateral amiotrófica foi realizado por WEIS et al., 2011. Este autor avaliou 28 pacientes com tempo médio de doença de 34 meses e comparou com controles saudáveis, encontrando redução na densidade de FNIE quando comparados com controles, sem relação com o sexo ou com duração de doença. Encontrou uma relação inversa com aumento de idade, e com a presença de queixas sensitivas, mas sem relação com alteração objetiva da sensibilidade , avaliadas por exame neurológico

e estudo eletrofisiológico. Em nosso subgrupo de ELA esporádica, a densidade de FNIE não se relacionou a queixa sensitiva.

No subgrupo da ELA 8, a densidade de FNIE não se correlacionou com a idade, havendo um achado de menor densidade de FNIE entre mulheres no grupo ELA 8 em relação ao homens do mesmo grupo, o que não encontramos justificativa. Embora os estudos de McCARTHY, 1998 e LAURIA, 1999 não tenham demonstrado diferenças entre os sexos, GORANSSON et al., 2004 e UMAPATHI et al., 2006 ao avaliar indivíduos saudáveis encontrou um discreto aumento na densidade de FNIE no sexo feminino.

Diferente do subgrupo de ELA esporádica, no subgrupo ELA 8 não havia diferença estatística entre densidade de FNIE e uso de VMNI (BiPAP) , o que pode ser justificado por serem pacientes mais jovens, com a maioria deles abaixo de 60 anos.

Neste subgrupo de ELA 8 , havia correlação direta entre presença de alterações na sensibilidade vibratória e redução de densidade de FNIE, semelhante ao descrito por WEIS et al., 2011.

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

1. O grupo de pacientes com ELA8 apresenta características demográficas e clínicas singulares: pacientes mais jovens, mais pacientes brancos, sintomas como câibras e tremor precedendo a fraqueza, menor envolvimento distal de membros inferiores, predomínio de sinais do neurônio motor inferior, bem como maior tempo de evolução da doença.
2. Queixas sensitivas e alteração objetiva da sensibilidade, especialmente alteração na sensibilidade vibratória, estiveram presentes em pacientes com ELA 8.
3. As alterações descritas previamente quanto a estrutura, acúmulo de glicosaminoglicanos e ferro, não foram reprodutíveis nos pacientes com ELA 8 ou naqueles com ELA esporádica.
4. O valor da densidade de fibras intraepidérmicas estava reduzido nos pacientes com ELA8 em relação a controles normais
5. As alterações sensitivas e a redução na densidade de fibras intraepidérmicas em ambos os grupos de ELA não apresentaram diferenças e são similares aos descritos previamente em pacientes com esclerose lateral amiotrófica.
6. Somente nos pacientes com ELA 8 havia relação positiva entre alteração de sensibilidade vibratória e redução de densidade de fibras nervosas intraepidérmicas.



## 8 ANEXOS

**Tabela 26:** Indivíduos controles normais, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos

Controle	Sexo	Idade (anos)	Cor
1	Masculino	45	Branco
2	Masculino	39	Preto
3	Masculino	47	Branco
4	Masculino	37	Branco
5	Masculino	24	Preto
6	Masculino	28	Branco
7	Masculino	42	Pardo
8	Masculino	34	Branco
9	Masculino	41	Preto
10	Masculino	38	Branco
11	Masculino	36	Branco
12	Masculino	35	Branco
13	Masculino	36	Pardo
14	Masculino	29	Branco
15	Masculino	20	Branco
16	Feminino	35	Preto
17	Feminino	39	Preto
18	Feminino	23	Branco

19	Feminino	40	Pardo
20	Feminino	38	Preto
21	Feminino	26	Branco
22	Feminino	36	Branco
23	Feminino	20	Preto
24	Feminino	36	Branco
25	Feminino	30	Preto
26	Feminino	46	Preto
27	Feminino	37	Preto
28	Feminino	29	Branco
29	Feminino	42	Branco
30	Feminino	31	Preto
31	Feminino	32	Branco
32	Masculino	28	Branco
33	Masculino	43	Preto
34	Feminino	36	Branco
35	Feminino	52	Branco
36	Feminino	40	Preto
37	Masculino	42	Pardo

---

<b>N:37 controles</b>	Masculino 18(48,6%)	Média 35,46± 7,49	Branco 20 (54,15)
	Feminino 19 ( 51,4%)		Pardos 5 ( 13,5%)
			Pretos 12 ( 32,4%)

**Tabela 27:** Pacientes com ELA esporádica, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos

ELA esporádica	Sexo	Idade	Cor
1	Feminino	58	Branco
2	Masculino	55	Pardo
3	Masculino	64	Pardo
4	Masculino	56	Branco
5	Masculino	50	Pardo
6	Feminino	62	Branco
7	Feminino	73	Branco
8	Masculino	53	Branco
9	Masculino	48	Branco
10	Feminino	34	Branco
11	Masculino	71	Pardo
12	Feminino	70	Preto
13	Feminino	72	Branco
14	Feminino	69	Branco

<b>N=14 pacientes</b>	Masculino 7 (50%)	Média	Branços 9 ( 64,3%)
	Feminino 7 ( 50%)		Pardos 4 ( 28,6%)
			Pretos 1 ( 7,1%)

**Tabela 28.** Dados clínicos pacientes com ELA esporádica

Elas esporádica	Idade de início fraqueza	Idade de início câibra	El Escorial
1	57	57	1
2	53		3
3	60		1
4	55		3
5	48	48	3
6	47		1
7	71	71	1
8	51	50	1
9	44		1
10	30		2
11	70	70	3
12	65		1
13	60		1
14	66	67	1
<b>N=14 pacientes</b>			

**Tabela 29.** Pacientes com ELA 8, relacionados por sexo, cor e idade expressa em anos

ELA 8	Sexo	Idade (anos)	Cor
1	Feminino	53	Branco
2	Masculino	64	Pardo
3	Feminino	42	Branco
4	Masculino	54	Branco
5	Feminino	37	Branco
6	Masculino	46	Pardo
7	Feminino	73	Branco
8	Feminino	38	Pardo
9	Masculino	41	Branco
10	Masculino	42	Branco
11	Masculino	57	Branco
12	Masculino	47	Branco
13	Masculino	65	Branco
14	Masculino	59	Branco
15	Masculino	57	Branco
16	Feminino	54	Branco
17	Masculino	66	Branco
18	Feminino	63	Branco
19	Feminino	47	Branco
20	Feminino	46	Branco

21	Feminino	52	Branco
22	Masculino	49	Pardo
23	Masculino	48	Pardo
24	Feminino	50	Branco
25	Masculino	53	Pardo
26	Feminino	52	Branco
27	Feminino	48	Branco
28	Feminino	51	Branco
29	Masculino	48	Pardo
30	Feminino	46	Branco
31	Masculino	48	Branco
32	Feminino	45	Branco
33	Feminino	51	Pardo
34	Masculino	65	Branco
35	Masculino	54	Branco
36	Feminino	55	Branco
37	Feminino	55	Branco
38	Masculino	52	Branco
39	Feminino	64	Branco
40	Masculino	58	Branco

---

--	--	--	--

---

<b>Total=40</b>	Masculino 20 (50%)	média	Branços 32 (80%)
	Feminino 20 (50%)		Pardos 8 (20%)
			Preto 0 (0%)

**Tabela 30.**Dados clínicos pacientes com ELA 8

ELA 8	Idade de fraqueza	Idade de câibras	Idade de tremor	EI Escorial
1	45	43	43	2
2	56	54	56	1
3	39	39	39	3
4	53	47	44	1
5	33	33	33	4
6	43	43		3
7	58	43	13	3
8			10	4
9			30	4
10		38	20	4
11	46	47		2
12		37	37	4
13	45	45	60	1
14	47	47	56	1
15	50	45		1
16	43		51	1
17	54	54		1
18	49	58		2
19	45	41	41	2

20	41	36	20	2
21	46	44	46	3
22	40	40	46	3
23	43	43	43	3
24	48		48	3
25	43	43	43	1
26	47	51	49	3
27	42	39	0	4
28	50	41	50	4
29	41	38	18	3
30	45	45		3
31	44	44	44	1
32	40	40	44	2
33	48	48		1
34	56	56	56	3
35	48	48	48	1
36	51	35	35	1
37	49	49	49	3
38	43	43	43	3
39	46	46	54	1
40	51	51	48	3

---



**Tabela 31-** Densidade de fibras intraepidérmicas nos indivíduos do grupo controle

Controle	Fibras/mm
1	4,3
2	5,3
3	5,0
4	3,3
5	8,6
6	3,3
7	3,6
8	4,6
9	4,6
10	11,6
11	5,3
12	3,3,
13	3,6
14	5,0
15	6,6
16	6,0
17	7,6
18	3,3
19	6,0
20	6,6

21	6,6
22	4,3
23	6,3
24	4,3
25	4,3
26	3,3
27	6,6
28	4,3
29	6,0
30	4,0
31	3,7
32	3,0
33	5,6
34	6,3
35	5,0
36	4,6
37	5,3

---

**Tabela 32-** Densidade de fibras intraepidérmicas no grupo ELA esporádica

ELA esporádica	Fibras/mm
1	3
2	4,6
3	1,0
4	1,7
5	3,0
6	3,0
7	1,3
8	4,6
9	4,3
10	5,3
11	2,0
12	3,6
13	3,0
14	1,6

**Tabela 33.** Densidade de fibras intraepidérmicas no grupo ELA 8

ELA 8	Fibras/mm
1	1,0
2	2,0
3	4,0
4	2,0
5	1,3
6	0,3
7	5,3
8	1,3
9	4,0
10	5,3
11	3,6
12	2,3
13	9,0
14	4,7
15	4,6
16	1,7
17	3,0
18	1,0
19	1,3
20	1,0

21	1,3
22	2,0
23	1,0
24	1,3
25	3,6
26	4,3
27	3,0
28	3,6
29	4,6
30	1,0
31	1,7
32	2,0
33	2,3
34	1,0
35	2,0
36	1,0
37	0,6
38	2,3
39	0,3
40	5,3

---

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 2009; 73 (17):1693-98.

Beach RL, Rao JS, Festoff BW, Reyes ET, Yanagihara R, Gaj-dusek DC. Collagenase activity in skin fibroblasts of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1986; 72:49–60.

Beghi E, Balzarini C, Bogliun G, et al. Reliability of the El Escorial diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 2002; 21: 265–70.

Benavides J, Camelin JC, Mitrani N, Flamand F, Uzan A, Legrand JJ, Gueremy C, Le Fur G. 2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission -- II. Biochemical properties. *Neuropharmacology* 1985; 24 (11): 1085-92.

Bird SJ, Rich MM. Critical illness myopathy and polyneuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2002;2(6):527-33.

Blanes L, Duarte IS, Calil JA, Ferreira LM. Rev Assoc Med Bras. Clinical and epidemiologic evaluation of pressure ulcers in patients at the Hospital São Paulo. Apr-Jun 2004;50(2):182-7.

Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders* 2000;1: 293–299.

Carvalho M, Swash M. Amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Current Opinion in Neurology* 2011;24: 487-503.

Castro-Costa CM, Oriá RB, Vale OC, Arruda JAM, Horta WG, D'Almeida JAC, Santos TJT, Ramos RSN, Gifoni MAC. Motor neuron diseases in the University Hospital of Fortaleza (Northeastern Brazil) – A clinico-demographic analysis of 87 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58(4):986-989.

Charcot J, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. Arch Physiol Norm Pathol 1869; 2: 354-744.

Chen YZ, Benett CL, Huynh HM, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). Am J Hum Genet 2004; 74: 1128-35

Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Morc G. Severely increased risk of ALS among italian Professional football players. Brain 2005; 128(pt3): 372-6

Cox PA, Banak SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. PNAS 2003; 100(23): 13380-13383.

Daoud H, Belzil V, Martins S, Sabbagh M, Provencher P, Lacomblez L, Meininger V, Camu W, Dupre´ N, Dion PA, Rouleau GA. Association of LongATXN2CAG Repeat Sizes With Increased Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch Neurol. 2011; 68(6):739-742.

Dietrich-Neto F, Callegaro D, Dias-Tosta E, Silva HA, Ferraz ME, Lima JMB, Oliveira ASB. Amyotrophic lateral sclerosis in Brazil 1998 National Survey. Arq Neuropsiquiatr 2000;58( 3-A): 607-615

Ebenezer GJ, Hauer P, Gibbons C, McArthur JC, Polydefkis M. Assessment of Epidermal Nerve Fibers: a new diagnostic and predictive tool for peripheral neuropathies. J Neuropathol Exp Neurol. 2007; 66 (12):1059-1073.

El-Salem K, Khassawneh B, Alrefai A, Dwairy AR, Rawashdeh S. Interval neurophysiological changes in non septic critically ill mechanically ventilated patients. J ClinNeurophysiol. 2012 ;29(4):349-52.

Engel W, Kurlan L, Klatzo I. An inherited disease similar to amyotrophic lateral sclerosis with a pattern of posterior column involvement. An intermediate form? Brain 1959;82:203-220.

Feldman EL. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases. In: Goldman L & Ausiello D (ed). Cecil Textbook of Medicine 22<sup>nd</sup> edition. Philadelphia (Pennsylvania): Saunders, 2004.

Forrest L, Dixon J, Jackson DS. Comparative studies on the insoluble collagens of guinea-pig dermis and dermal scar tissue. *Connect Tissue Res* 1972; 1: 243-250.

Funke AD, Esserb M, Krüttgen A, Weisb J, Mitne-Neto M, Lazarc M, Nishimura AL, Sperfeld AD, Trillenber P, Senderek J, Krasnianskia M, Zatz M, Zierza S, Deschauer M. The p.P56S mutation in the VAPB gene is not due to a single founder: the first European case. *Clin Genet* 2010; 77: 302 – 303.

Gefen A. The biomechanics of sitting-acquired pressure ulcers in patients with spinal cord injury or lesions. *Int Wound J* 2007; 4:222–231.

Goransson LG, Mellgren SI, Lindal S, Omdal R. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology* 2004;62: 774-77.

Gordon PH. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs* 2011;25(1):1-16.

Grossman A, Bradley W. Psychosocial factors and cognition in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motro neuron disorders* 2003; 4: 217-224.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in a familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 2001; 29: 166-73

Hammad M, Silva A, Glass J, Sladky JT, Benatar M. Clinical, electrophysiologic, and pathologic evidence for sensory abnormalities in ALS. *Neurology* 2007; 69(11):2236-42.

Hardiman O. Symptomatic treatment of respiratory and nutritional failure in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2000 Apr;247(4):245-51.

Heads T, Pollock M, Robertson A, Sutherland W, Allpress S. Sensory nerve pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1991;82:316-320.

Hirano A, Kurland LT, Sayre GP. Familial amyotrophic lateral sclerosis. A subgroup characterized by posterior and spinocerebellar tract involvement and hyaline inclusions in the anterior horn cells. *Arch Neurol*. 1967;16(3):232-43.



Hirano M, Quinzii CM, Mitumoto H, Hays AP, Roberts JK, Richard P, Rowland LP. Senataxin mutations and amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2011; 12: 223–227.

Hulette CM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Schmechel DE, Yamaoka LH, Gaskell PC, Welsh-Bohmer KA, Crowther RA, Spillantini MG. Neuropathological features of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17q21-22 (FTDP-17): Duke Family 1684. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58(8):859-66.

Hsiung- Fei C, To- Jung T, Whei-Min L, Chih-Chao Y, Yang-Chyuan C, Rong-Chi C, Sung-Tsan H. Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 455-461.

Jainska-Myga B, Wider C. Genetics of essential tremor. *Parkinsonism and Related Disorders* 2012;18: S138–S139.

Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ. Amyloid  $\beta$ -protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 1989; 341: 226-230.

Junqueira, LC. Carneiro, J. *Histologia Básica* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara –Koogan S/A. 433 p, cap 4: tecido epitelial, 1998.

Kato S, Oda M, Murahashi M, Suda N. Motor neuron disease with involvement of the pallido-luysio-nigral system and mesencephalic tegmentum. *Clin Neuropathol* 1995;14:241–244.

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011;377:942-55.

Lauria G, Holland N, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Epidermal innervations: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *J Neurol Sci* 1999;164(2):172-178.

Lauria G, Cornblath DR, Johansson O. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747-58

Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Legere JM, Mellgren SI, Nolan M, Merkies ISJ, Polydefkisi M, Smith AG. European Federation of Neurological

Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *European Journal of Neurology* 2010; 17:903–912.

Lechtzin N, Rothstein J, Clawson L, Diette GB, Wiener CM. Amyotrophic lateral sclerosis: evaluation and treatment of respiratory impairment. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disorders* 2002 Mar; 3(1):5-13.

Luigetti M, Conte A, Del Grande A, Bisogni G, Romano A, Sabatelli M. Sural nerve pathology in ALS patients: a single-centre experience. *Neurol Sci* 2012; 33:1095–1099.

McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: Normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55:1513-20.

McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Cutaneous innervations in sensory neuropathies: Evaluation by skin biopsy. *Neurology* 1995; 45:1848-1855.

McCombe, PA, Henderson RD. Effects of Gender in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gender Medicine*,2010;7 (6): 557-570.

Mendell JR, Florense J. Manual muscle testing. *Muscle & Nerve* 1990;13:S16-20

Meiniger V. ALS, what new 144 years after Charcot. *Archives Italiennes de Biologie* 2011;149: 29-37.

Merner ND, Girard SL, Catoire H; Bourassa CV, Belzil VV, Rivière J, Hince P, Levert A, Dionne-laporte A, Spiegelman D, Noreau A, Diab S, Szuto A, Fournier H, Raelson J, Belouchi M, Panisset M, Cossette P, Dupré N, Bernard G, Chouinard S, Dion PA, Rouleau GA. Exome Sequencing Identifies FUS Mutations as a Cause of Essential Tremor. *The American Journal of Human Genetics* 2012;91(10): 313–319.

Michalany, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. 3.ed. São Paulo: Editora Michalany, 1998.

Millecamps S. SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype -phenotype correlations. *J Med Genet* 2010;47:554-560.

Mondelli M, Rossi A, Passero S, Guazzi GC. Involvement of peripheral sensory fibers in amyotrophic lateral sclerosis: electrophysiological study of 64 cases. *Muscle Nerve* 1993;16:166-172.

Moura L, Oliveira ASB, Zanoteli E, Cardoso R, Schmidt B, Gabbai AL. Padronização normal das fibras nervosas intraepidérmicas em 30 voluntários saudáveis com PGP 9.5. *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62(2-A):271-275.

Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Oliveira JR, Vainzof M, Zatz M. A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J Med Genet* 2004 ;41:315–320

Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, et al. A mutation in the Vesicle- Trafficking Protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 822-31

Nishimura AL, Al-Chalabi A, Zatz M. A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. *Hum Genet* 2005: 118: 499 – 500.

Ochoa J. Recognition of unmyelinated fiber disease: morphologic criteria. *Muscle & nerve* 1978; Sep-Oct 1(5):375-87.

Ono S, Toyokura Y, Mannen T, Ishibashi Y. Amyotrophic lateral sclerosis: histological, histochemical and ultrastructural abnormalities of skin. *Neurology* 1986; 36: 948-956.

Ono S, Toyokura Y, Mannen T, Ishibashi Y. “Delayed Return Phenomenon” in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1988; 2: 243-256.

Ono S, Yamauchi M. Collagen cross-linking of skin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1992; 31: 305-310.

Ono S, Nagao K, Yamauchi M. Amorphous material of the skin in amyotrophic lateral sclerosis: a morphological and biochemical study. *Neurology* 1994; 44: 537-540.

Ono S, Imai T, Yamauchi M, Kagao K. Hyaluronic acid is increased in skin and urine in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1996; 243: 693-699.

Ono S, Imai T, Takahashi K, et al. Decreases type IV collagen of skin and serum in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1998; 51: 114-120.

Ono S. The skin in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders* 2000;(1):191–199.

Oriá RB, Ferreira FVA, Santana EN, Fernandes MR, Brito GAC. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An bras Dermatol* 2003;78(4):425-434.

Ozge A, Atış S, Sevim S. Subclinical peripheral neuropathy associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Electromyogr. Clin Neurophysiol.* 2001;41(3):185-91.

Reddy M, Gill SS, Rochon PA. Preventing pressure ulcers: a systematic review. *JAMA* 2006 Aug 23; 296(8): 974-84.

Rizzardini M, Mangolini A, Lupi M, Ubezio P, Bendotti C, Cantoni L. Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J Neurol Sci.* 2005 May 15;232(1-2):95-103.

Rocha AJ, Maia Junior, ACM. Is magnetic resonance imaging a plausible biomarker for upper motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/primary lateral sclerosis or merely a useful paraclinical tool to exclude mimic syndromes? A critical review of imaging applicability in clinical routine. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 2012; 70(7):532-539.

Rodriguez GE, González DMC, Monachelli GMG, Costa LJJ, Alejandro FN, Sica REP. Morphological abnormalities in mitochondria of the skin of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arq Neuropsiquitr* 2012;70(1):45-51.

Ross MA, Miller RG, Berchert L, et al. Toward earlier diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: revised criteria. *Neurology* 1998; 50: 768–72.

Rowland LP. Hereditary and Acquired Motor Neuron Diseases. In: Roland LP (ed). *Merritt's Neurology*. New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

Shea JD. Pressure sores: classification and management. *Clin Orthop Relat Res* 1975;112:89–100.

Siddique T, Ajroud-Driss S. Familial amyotrophic lateral sclerosis, a historical perspective. *Acta Myologica* 2011; 30(2):117-120.

Silani V, Fogh I, Ratti A, Sassone J, Ciammola A, Cova L. Stem cells in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *ALS and other motor neuron disorders* 2002;3:173-181.

Silani V, Messina S, Poletti B, Morelli C, Doretti A, Ticozzi N, Madern L. The diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 2011; 149: 5-27.

Sommer C. Skin biopsy as a diagnostic tool. *Current Opinion in Neurology* 2008; 21:563–568.

Spataro R, Bono V, Marchese S, La Bella V. Tracheostomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Clinical features and survival analysis. *Journal of the Neurological Sciences* 2012;323:66–70.

Stefanini M, Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967;216:173-174.

Strong M, Rosenfield J. Amyotrophic Lateral Sclerosis: a review of current concepts. *ALS and other motor neuron disorders* 2003; 4: 136-143

Strong MJ, Gordon PH. Primary lateral sclerosis, hereditary spastic paraplegia and amyotrophic lateral sclerosis: discrete entities or spectrum?. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2005; 6(1): 8-16.

Suzuki M, Mikami H, Wataneb T, Yamano T, Yamazaki T, Nomura M, Yasui K, Ishikawa H, Ono S. Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2010; 122: 367–372

Teive HAG, Genaro RW ,Campos RWGR, Werneck LC. Pressure ulcers and Charcot's definitions: report on two cases. *Sao Paulo Med J.* 2008;126(4):223-4.

Ticozzi N, Tiloca C, MORELLI C, Colombrita C, Poletti B, Doretti A, Maderna L, Messina S, Ratti A, Silani V. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie* 2011; 149: 65-82.

Toepfer M, Folwaczny C, Klauser A, Riepl RL, Müller-Felber W, Pongratz D. Gastrointestinal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders* 1999; 1: 15-19.

Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Clinical features of Amyotrophic Lateral Sclerosis according to the El Escorial and Airlie House Diagnostic Criteria. *Arch Neurol* 2000; 57: 1171–76.

Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, Cudkowicz ME. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 2006 Jul 11; 67(1): 20-7.

Umapathi T, Tan WL, Tan NC, Chan YH. Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve* 2006;3: 742-746.

Viera, S. *Bioestatística: Tópicos Avançados*. Rio de Janeiro: Campus-Elsevier, 2004.

Weis J, Katona I, Muller-Newen G, Sommer C, Necula G, Hendrich C, Ludolph AC, Sperfeld AD. Small-fiber neuropathy in patients with ALS. *Neurology* 2011;7 (7): 2024-2029.

Werneck LC, Bezerra R, Neto AS, Scola RH. A clinical epidemiological study of 251 cases of amyotrophic lateral sclerosis in the south of Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr* 2007;65(2A):189-95.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, et al. The gene encoding Alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001; 29: 160-65.

Zoccolella S, Beghi E, Palagano G, Fraddosio A, Samarelli V, Lamberti P, Lepore V, Serlenga L, Logroscino G. Predictors of delay in the diagnosis and clinical trial entry of amyotrophic lateral sclerosis patients: A population-based study. *Journal of the Neurological Sciences* 2006; 250: 45–49.

## ABSTRACT

**Background:** Amyotrophic lateral sclerosis(ALS) is a progressive and incurable degenerative disease of the central nervous system, with a multifactorial origin. Spasticity, hyperreflexia, Babinski sign, atrophy and muscle weakness, twitching and cramps are the main clinical manifestations. Sensory involvement is rarely seen in this disease, although limited motor function and let patient confined to a wheelchair and bed, has a very rare distinction of developing bedsores. About 90% of ALS cases are sporadic presentation and 10% familiar ones. The Familial ALS type 8 (FALS-8) was first described in Brazil, with a large number of families described to date. This form of disease presents clinical peculiarities in its presentation as more important involvement of these cond neuron, intention tremor and evolution slower than that observed in sporadic forms of ALS.

**Objective:** To describe the sensory changes and histological skin in patients with FALS-8 and compare the findings in patients with sporadic ALS and controls. We selected 40 patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis Family type 8 and 14 patients with sporadic ALS and evaluated by neurological examination and electromyography, with attention to sensory complaints and objective changes of sensitivity. Skin biopsies were performed in these patients and in 37 controls on the lateral distal right leg. Biopsies were processed using indirect immunofluorescence using PGP 9.5 .15 individuals , five in each group, type 8 ALS, sporadic ALS and control biopsies were also performed on the lateral left leg distal, with evaluation of epidermal thickness and research of glycosaminoglycans by staining with colloidal iron and alcian blue. Data were analyzed by Graphpad Prism 5.3. **Results:** When comparing the clinical characteristics of patients with ALS, the FALS-8 subgroup has age of onset younger with cramp and tremor preceding weakness. Tremor besides being present in 82.5% of patients, with a predominance of signs of lower motor neuron and longer time of disease progression in this subgroup. Sensory deficits were found in both groups of ALS. A reduction of INFD occurred similarly in both forms of ALS as compared to controls. The changes described previously as the structure, accumulation of glycosaminoglycans and iron was not reproducible in patients with ALS studied. **Conclusions:** The subgroup FALS-8 presents

demographic and clinical characteristics distinct from sporadic ALS group. Changes in sensitivity and IFND are similar to those previously observed in patients with ALS.



## APENDICE

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é a forma mais comum de doença de neurônios motores (células responsáveis pelo movimento dos músculos) no adulto. A ELA é uma doença possivelmente de múltiplas causas em que ocorre a degeneração desses neurônios motores e, conseqüentemente, alterações de força muscular, de fala, de marcha, entre outras. As informações a seguir estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária no estudo **“Estudo da pele na Esclerose Lateral Amiotrófica”**, que visa: 1. encontrar a razão pela qual os pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica não desenvolvem úlceras de decúbito (escaras; feridas que aparecem em locais do corpo submetidos a pressão, como as costas) mesmo após longos períodos acamados; 2. Explicar como os neurônios morrem na ELA. Participarão do estudo pacientes com a forma familiar ELA8, ELA forma esporádica além de indivíduos sem doenças que serão o grupo controle.

Os integrantes do grupo controle e do grupo de estudo (portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica tipo 8 e esporádica) deverão passar por uma *entrevista* para a coleta de dados gerais (idade, sexo, profissão e sintomas) e um *exame neurológico* detalhado com a pesquisadora. A seguir, serão submetidos a duas *biópsias de pele*, técnica que usamos para retirar o pedaço de pele a ser analisado. As biópsias serão realizadas na parte lateral de ambas as pernas após a aplicação de anestésico local, permitindo a obtenção de dois fragmentos de pele de 3 milímetros de diâmetro. Por fim, será dado um ponto para fechar o local da biópsia, o qual poderá ser posteriormente retirado no Setor de Neuromuscular sob supervisão do Dr. Acary Souza Bulle Oliveira. O procedimento descrito anteriormente pode ser um pouco doloroso, mas *oferece riscos mínimos*, como hematoma, aos voluntários do estudo. Além disso, todo o material utilizado para a biópsia será *esterilizado*, de tal forma que o risco de infecção local é igualmente pequeno. Esse procedimento não é experimental, sendo utilizado rotineiramente na prática médica para o estudo da pele. A primeira parte das amostras recolhidas dos pacientes e do grupo controle será, posteriormente, submetida a diversas reações químicas para que possam ser analisados os nervos e a composição da pele. A segunda parte das amostras será utilizada para cultura de células da pele (fibroblastos), onde as células são colocadas em meio nutriente para se multiplicarem e, a seguir, as células são estimuladas para se especializarem em células nervosas (neurônios). Esse estudo vai permitir entender melhor como ocorre a degeneração celular na doença ELA.

Todas as informações recolhidas dos integrantes do estudo serão confidenciais, o material coletado será usado apenas para esta pesquisa e os participantes não terão qualquer despesa financeira durante a mesma.

É importante ressaltar que não haverá benefícios diretos para os participantes, nem mesmo compensações financeiras. Entretanto, os resultados obtidos certamente contribuirão para ampliar o conhecimento sobre Esclerose Lateral Amiotrófica. Além disso, os pacientes terão direito de se manter atualizados sobre os resultados parciais da pesquisa.

Cabe lembrar também que, em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos neste estudo (nexo causal comprovado), o paciente terá direito a tratamento médico nesta instituição, bem como a indenizações legalmente estabelecidas. Por fim, é garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer instante, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento no Setor de Neuromuscular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM). Em caso de eventuais dúvidas, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa em qualquer etapa do estudo. Os principais investigadores são a médica Marcela Machado Costa (aluna de pós-graduação em Medicina pela UNIFESP-EPM) e o biólogo Miguel Mitne Neto (aluno de pós-graduação em Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP), e a médica responsável pelo estudo é Dra. Helga Cristina Almeida Silva. Eles podem ser encontrados no endereço Rua Pedro de Toledo 377 ou nos telefones 5083-1051 ou 3091-7563. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa na Rua Botucatu 572 1º andar, pelo telefone 5571-1062 ou pelo FAX 5539-7162.

#### Declaração do Voluntário

Acredito ter sido suficientemente informado sobre minha participação no estudo. Após discussão com a investigadora Marcela Câmara Machado Costa, ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar a qualquer momento o meu consentimento, antes ou durante a pesquisa, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento nesse Serviço.

Assinatura do paciente ou representante legal

\_\_\_\_\_ Data:

Assinatura da testemunha (pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

\_\_\_\_\_ Data:

Declaração do Pesquisador

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ Data: